

Aus dem Zentrum für Anatomie und Cytobiologie
der Justus Liebig-Universität Giessen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Oksche

Cytometrische und mikrospektrographische
Studien über Wechselbeziehungen zwischen
Endothel-, Glia- und Ganglienzellen

Habilitationsschrift
am Bereich Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Peter Zimmermann

1973

Aus dem Zentrum für Anatomie und Cytobiologie
der Justus Liebig-Universität Giessen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Oksche

Cytometrische und mikrospektrographische
Studien über Wechselbeziehungen zwischen
Endothel-, Glia- und Ganglienzellen



Habilitationsschrift
am Bereich Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Peter Zimmermann

Das Institut für Anatomie und Otolaryngologie
der Universität Bonn
Gesellschaft der Freunde der Universität Bonn

Cytometrische und mikroskopische
Studien über Wechselwirkungen zwischen
Endothel-, Glia- und Ganglienzellen



Medizinische Fakultät
an der Universität
der Stadt Leiden

Verlag von

Verlag J.B. Metzger

Inhaltsverzeichnis

1.	Fragestellung	S. 1-8
2.	Material und Methoden	S. 9-13
3.	Theoretische Überlegungen und Synopsis der Ergebnisse	
3.1.	Graphentheoretische Untersuchung der funktionellen Kerngrößenänderung in Nervenzellen	S. 14-18
3.2.	Graphentheoretische Untersuchungen über Wechselbeziehungen innerhalb von Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexen	S. 18-19
3.3.	Untersuchungen über Wechselbeziehungen zwischen Neuronen und dem cerebralen Kapillarsystem am Modell der antidromen Langzeitstimulation von Vorderhornneuronen der Albinoratte	S. 20-21
3.4.	Untersuchungen über Wechselbeziehungen zwischen Nervenzell-Glia-Komplexen und cerebralem Kapillarsystem am Modell der neuroendokrinen Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushalts bei <u>Lumbricus terrestris</u> L.	S. 22-26
3.5.	Untersuchungen über Wechselbeziehungen zwischen Nervenzell-Glia-Komplexen und cerebralem Kapillarsystem am Modell des kälteinduzierten Hirnödems beim Kaninchen	S. 26-29
4.	Zusammenfassung und Ausblick	S. 30-35
5.	Literatur	S. 36-42
6.	Abbildungen zu 1. - 3.5.	S. 43-52
7.	Veröffentlichungen zum Thema	
7.1.	Änderungen des Aktivitätsmusters der Vorderhornneurone der Albinoratte nach antidromer Langzeitreizung	S. 53
7.2.	Untersuchungen an Nervenzell-Glia-Komplexen und Kapillaren im Oberschlundganglion von <u>Lumbricus terrestris</u> L.	

- 7.2.1. Zusammenfassung der Beiträge: S. 54-70
- a) ZIMMERMANN, P.: Beziehungen verschieden-
artiger Zellkomplexe des normalen und regenerieren-
den Nervensystems von Lumbricus terrestris L.
zum Gefäßsystem.
Z.Zellforsch. 106, 423-438 (1970)
- b) ZIMMERMANN, P.: Die intracytoplasmatische
Organellenverteilung als Indikator gerichteter
Wechselbeziehungen zwischen Kapillarsystem und
zentralnervösen Zellkomplexen. Morphometrische
Studien am Oberschlundganglion von Lumbricus
terrestris L.
Z.Zellforsch. 110, 268-283 (1970)
- c) ZIMMERMANN, P.: Die zentralnervöse Kontrolle
der Dehydration bei Lumbricus terrestris L.
Z.Zellforsch. 112, 551-571 (1971)
- 7.2.2. Zur neuronalen Regulation des Wasserhaushalts bei
Lumbricus terrestris L. S. 71
- 7.3. Kälteinduzierte Ödem- und Nekrosenentwicklung im
Parietalcortex von Kaninchen.
Acta Neuropath. (im Druck) S. 72-122

Liste der Veröffentlichungen, die für die Habilitationsschrift
verwandt wurden:

I. Änderungen des Aktivitätsmusters der Vorderhornneurone
der Albinoratte nach antidromer Langzeitreizung.

(Mitautoren: H. WOLFF, F.W. KLUSSMANN)

Z. Zellforsch. 145, 229 - 245 (1973).

II. a) Beziehungen verschiedenartiger Zellkomplexe des nor-
malen und regenerierenden Nervensystems von Lumbricus
terrestris L. zum Gefäßsystem.

Z. Zellforsch. 106, 423 - 438 (1970).

b) Die intracytoplasmatische Organellenverteilung als Indika-
tor gerichteter Wechselbeziehungen zwischen Kapillarsystem
und zentralnervösen Zellkomplexen. Morphometrische Studien
am Oberschlundganglion von Lumbricus terrestris L.

Z. Zellforsch. 110, 268 - 283 (1970).

c) Die zentralnervöse Kontrolle der Dehydration bei Lumbricus
terrestris L.

Z. Zellforsch. 112, 551 - 571 (1971).

d) Zur neuronalen Regulation des Wasserhaushalts bei Lumbricus
terrestris L.

Z. Zellforsch. 145, 103 - 118 (1973).

III. Kälteinduzierte Ödem- und Nekroseentwicklung im Parietalcortex
von Kaninchen.

(Mitautoren: C. GAGEL, H. ZIMMERMANN, I. MÜLLER)

Acta Neuropath. (Im Druck).

1.1. Fragestellung

Sowohl die elektrische als auch die neurohumorale Aktivität von Nervenzellen hängen in hohem Maße von einem ungestörten Metabolitenaustausch zwischen Kapillarsystem und Nervengewebe ab. An diesem Prozeß ist die Neuroglia beteiligt. Die Dynamik der Neuron-Glia-Wechselbeziehung wurde erstmals von CAJAL (1928) aus der Beobachtung der Proliferation glöser Satellitenzellen (Oligo- und Mikrogliazellen) in der Nachbarschaft degenerativ veränderter Neurone postuliert und als "Neuron-Neuroglia-Symbiose" bezeichnet. Dieses Konzept wurde von HYDEN (Übersicht, 1967) in Untersuchungen mit biochemischen Mikromethoden an isolierten Nerven- und Gliazellen weiterentwickelt: Nach 6tägiger Stimulation des Vestibularis-Systems von Kaninchen steigt mit der Aktivität von Enzymen des Citrat-Cyclus und der Atmungskette in Neuronen des Nucleus Deiters die RNS- und Proteinkonzentration gleichsinnig signifikant an, während in den perineuronalen Gliazellen gegenläufige Änderungen des RNS- und Proteingehalts sowie eine gesteigerte Glykolyse gemessen werden. Den stimulierten Neuronen stehen dadurch mehr energiereiche Metaboliten zur ATP-Bildung zur Verfügung. Diese Befunde sprechen für eine hohe Effektivität der metabolischen Kopplung zwischen Neuronen und ihren Glia-satelliten.

Auch der ATP-verbrauchende $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Austausch während der Neuronaktivierung ist an die funktionelle Kopplung zwischen Glia- und Ganglienzellen gebunden, wie KUFFLER und NICHOLLS (1966) am Nervus opticus von Necturus gezeigt haben. Jeder axonal fortgeleitete Impuls wird von einer Gliazelldepolarisation begleitet, deren Ausmaß von der Zahl der gleichzeitig erregten Axone, der Frequenz bzw. Dauer der Nervenstimulation und dem Ruhepotential der periaxonalen Gliazellen abhängt. Die Axonentladung führt über eine Erhöhung der K^+ -Konzentration im Interzellular-

spalt zur Depolarisierung benachbarter Gliazellen. HENN u.a. (1972) wiesen an isolierten Glia- bzw. Neuronenfraktionen des Kaninchens nach, daß nur die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase der Gliazellmembranen genügend Empfindlichkeit und Aktivität besitzt, um den neuronalen K^+ -Efflux zu kontrollieren, der im Verlauf der Ganglienzelldepolarisation auftritt.

Am gleichen Material studierte HAMBERGER (1971) den zentralnervösen Proteinstoffwechsel und fand, daß in Ganglienzellen die Proteinsynthese überwiegt, während Gliazellen freie Aminosäuren akkumulieren. Hierdurch könnten Gliazellen den Substratspiegel für die neuronale Proteinsynthese regulieren.

Um die geschilderten engen metabolischen Wechselbeziehungen aufrechtzuerhalten, müssen die Austauschstrecken zwischen Neuronen und Gliazellen möglichst kurz sein. Diese Bedingung wird durch die hohe Packungsdichte aneinandergrenzender Nerven- und Gliazellfortsätze erfüllt: Die Plasmalemmata der Neurone und der benachbarten Gliazellen sind durchschnittlich nur 10 - 20 nm voneinander entfernt (HORSTMANN und MEVES, 1959; s.a. TORACK u.a., 1965). Die Interzellularspalten hemmen zwar die Ausbreitung elektrischer Signale von Neuronen auf Gliazellen, stellen aber keine Barrieren für den interzellulären Metabolitenaustausch dar (KUFFLER und NICHOLLS, 1966). Ein kontinuierlicher Transport energieliefernder Substrate - vor allem der Glucose - ist im Nervensystem besonders wichtig, da Glykogen hier als Energiespeicher nur eine untergeordnete Rolle spielt und "somit die sofort verwendbaren Kohlenhydratreserven des Gehirns geringer als in vielen anderen Organen sind (OPITZ und SCHNEIDER, 1950). Außerdem wird ein Teil der aufgenommenen Glucose in Aminosäuren umgewandelt und geht der direkten Energiegewinnung aus dem Emden-Meyerhof-Zyklus verloren (ERBSLÖH, 1953; QUASTEL, 1969); folglich sind Glucose- und Sauerstoffzufuhr über das Gefäßsystem begrenzende Faktoren des cerebralen Energiestoffwechsels. Da der Sauerstoffaustausch zwischen Gefäßkompartiment und angrenzendem Gewebsareal im Kapillarstromgebiet erfolgt,

(Übersicht s. ILLIG, 1961), läßt sich die zentralnervöse metabolische Funktionseinheit cytologisch als "Kapillarendothel-Glia-Nervenzell-Komplex" definieren. Eine Unterteilung des Gewebes in Bezirke, die von einer zentralgelegenen Kapillare aus versorgt werden, geht auf Untersuchungen von KROGH (1919) zurück. Dieser sog. "Krogh'sche Gewebszylinder" erlaubt erstmals Zusammenhänge zwischen Gewebsaufbau und -metabolismus exakt quantitativ zu beschreiben. Als Voraussetzung gilt, daß benachbarte Kapillaren parallel verlaufen und in gleicher Richtung perfundiert werden. Da dies nicht die tatsächlichen Kapillar-Gewebsbeziehungen im Gehirn widerspiegelt, wurde das Krogh'sche Modell mehrmals modifiziert. Nach DIEMER (1965) liegen die Hirnkapillaren zwar parallel nebeneinander, werden aber antiparallel durchströmt. Hieraus folgt, daß das perikapilläre Gewebsareal nicht Zylinder- sondern Kegelstumpfform annimmt. Vorteil des Kegelstumpf-Modells ist, daß die anoxiegefährdete Zone zwischen angrenzenden Kapillargebieten verkleinert wird. Letzteres läßt sich noch weiter verbessern, wenn man wie GRUNEWALD (1968) eine asymmetrische räumliche Kapillarverteilung und eine ungerichtete Kapillarperfusion voraussetzt. Die Entwicklung der verschiedenen Modelle führte zu einer genaueren Beschreibung der intravitalen cerebralen Kapillar-Gewebsbeziehungen, jedoch sind hierfür die von KROGH (1919) aufgestellten Kriterien immer noch maßgebend: Die Größe der Sauerstoffdiffusion hängt vom Sauerstoffdruckgradienten zwischen dem Blut im entsprechenden Kapillarabschnitt und dem angrenzenden Hirngewebszylinder ab. Der Druckabfall wird bestimmt durch die folgenden Variablen (vgl. OPITZ und SCHNEIDER, 1950):

1. Dem Sauerstoffverbrauch der Neuron-Glia-Komplexe,
2. der Diffusionsoberfläche, d.h. dem Radius der Kapillare,
3. der Diffusionsstrecke, d.h. dem Abstand zwischen Kapillare und Nervenzell-Glia-Komplex (Radius des Gewebszylinders).

Der lokale corticale O_2 -Verbrauch beträgt mit gasanalytischen Mikromethoden gemessen, etwa $8 \text{ ml } O_2 / 100 \text{ g} \times \text{min}$ (LÜBBERS, 1968). Über den

Anteil von Nerven- bzw. Gliazellen am lokalen O_2 -Verbrauch fehlen exakte Angaben aus in vivo-Experimenten. An Gewebsschnitten der Großhirnrinde ließ sich jedoch errechnen, daß ca 70 % der O_2 -Aufnahme auf Neurone entfällt (COULTER, 1958). Nimmt man die ATP-Syntheserate als Schätzgröße des O_2 -Umsatzes an, so dürften Neurone etwa dreimal mehr Sauerstoff verbrauchen als Gliazellen (ROSE und SINHA, 1969).

Kapillardurchmesser und -abstand hängen vom Gewebsaufbau, d.h. dem Verzweigungsmuster der Kapillaren und der perikapillären Anordnung von Nervenzell-Glia-Komplexen ab. Als Beispiel für die Beziehungen zwischen Kapillarradius und Größe des Gewebszylinders können die Kapillarmessungen von DIEMER (1965) an Cortex-Querschnitten angeführt werden: Der mittlere interkapilläre Abstand verkürzt sich von 56×10^{-4} cm auf 54×10^{-4} cm durch hypoxiebedingte Kapillarerweiterung. Kaliberänderungen von Hirnkapillaren sollen durch folgende Prozesse möglich sein (Diskussion s. GÄNSHIRT, 1972): 1) Schwellung der perikapillären Astrozyten, 2) Kontraktion der Perizyten und 3) Endothelzellschwellung. Außerdem hängen Kapillarperfusion und -weite von Regulationen in der vorgeschalteten terminalen Hirnstrombahn ab. Hier entfalten vor allem blutchemische Faktoren ihre Wirkung, z.B. führt ein Anstieg von CO_2 zur Gefäßerweiterung (WOLFF u.a., 1930). Auch mechanogene Faktoren spielen eine Rolle; Dehnung der Gefäßwand durch Erhöhung des Perfusionsdruckes wird mit einer aktiven Tonusänderung der glatten Wandmuskelzellen beantwortet (ZWETNOW, 1968). Demgegenüber fehlen experimentelle Beweise für eine deutliche Beeinflussung der Hirndurchblutung über Gefäßnerven. Die Feinregulation des corticalen Sauerstoffbedarfs erfolgt wahrscheinlich über stoffwechselabhängige Änderungen des p_{CO_2} -Gradienten zwischen Gefäß und Gewebe (SOKOLOFF, 1959) und stellt eine Anpassung der Durchblutung an lokale Gewebsbedürfnisse dar. Der letztgenannte Regelvorgang dürfte von unterschiedlicher Effektivität für die O_2 -Versorgung perikapillärer Nervenzell-Glia-Komplexe sein, da die Diffusionsstrecken zwischen Nervenzellen und Kapillaren sehr variabel

sind. E. SCHARRER (1937) unterscheidet vier Typen von Kapillar-Nervenzell-Beziehungen: 1) Perivaskuläre Anordnung von Nervenzellen (z.B. Nucleus supraopticus des Menschen). Das Gefäßnetz bestimmt die Verteilung von Nervenzellen, d.h. ein Blutgefäß bildet die "zentrale Achse einer solchen Zellgruppe". 2) Perizelluläre Anordnung von Kapillaren (z.B. Nucleus dentatus des Menschen). "Dies ist dann der Fall, wenn eine oder mehrere Kapillaren eine Nervenzelle gleichsam umrahmen....." 3) "Endozelluläre" Kapillaren (z.B. Nucleus supraopticus und paraventricularis des Menschen). Kapillaren liegen in Einbuchtungen der Zelloberfläche und haben dadurch einen besonders innigen Kontakt mit dem entsprechenden Neuron. "Der Sauerstoffverbrauch und der lebhafteste Stoffwechsel dieser sekretorisch tätigen Nervenzellen sind offensichtlich die Ursache dafür, daß eng anliegende perizelluläre Gefäße nicht genügen; es wird eine Art von Kanalisierung des Zellplasmas notwendig." 4) Die Lage der Nervenzellen läßt keine besondere Beziehung zu den Blutgefäßen erkennen (gilt für den größten Teil des Zentralnervensystems).

Weiterhin geben Verteilung und Struktur von Mitochondrien in Nervenzell-Glia-Komplexen Auskunft über metabolische Wechselbeziehungen zwischen Gefäßsystem und benachbarten Zellelementen. E. SCHARRER (1945) konnte lichtmikroskopisch in Neuropilformationen des Bulbus olfactorius von Anquilla rostrata außer einer hohen Kapillardichte eine ausgeprägte perikapilläre Ansammlung von Mitochondrien nachweisen und deutete diese Befunde so, "that the correlation between capillary density and the number of mitochondria in neuropil is not a coincidence, but the anatomical expression of a functional relationship." Eine weitere Differenzierung der regionalen Mitochondrienverteilung gelang PYSH und KAHN (1972) durch morphometrische Auswertung elektronenmikroskopischer Aufnahmen aus verschiedenen Hirnregionen der Ratte. Im untersuchten Material war der mitochondriale Anteil am Zellvolumen am höchsten in Neuronen der Radix mesencephalica N. trigemini (8,5 %), gefolgt von Neuronen des Colliculus inferior (7 %),

zervikalen Motoneuronen (6,2 %), Neuronen des dorsalen Vagus-kerns (5,6 %); er war am geringsten in Neuronen aus dem Stratum granulosum des Cerebellum (3,3 %). Eine ähnliche Reihe ließ sich für die Mitochondrienverteilung in Gliazellen aufstellen: Den höchsten mitochondrialen Volumenanteil fand man in Astrozyten der Pyramidenbahn (7 %), gefolgt von Astrozyten des medullären zentralen Graus (6,5 %), Oligodendrozyten der Pyramidenbahn (3,4 %) sowie des Nervus opticus (3,3 %) und Astrozyten des Nervus opticus (2,8 %). Als weiteren Parameter für die Stoffwechselaktivität von Mitochondrien haben PYSH und KAHN (1972) die Packungsdichte der Cristae herangezogen; sie fanden, daß der Cristae-Anteil am Mitochondrienvolumen in Neuronen etwa 17,3 % in Astrozyten 11 % und Oligodendrozyten 11,3 % beträgt. Dieser morphometrische Befund stimmt mit den obengenannten biochemischen Ergebnissen überein, die - im Vergleich zu den Gliazellen - auf einen höheren O_2 -Verbrauch der Neurone hinweisen. Die morphometrischen Untersuchungen von PYSH und KAHN (1972) erlauben zwar die quantitative Beschreibung regionaler Strukturunterschiede von Nervenzell-Glia-Komplexen, allerdings geben erst cytometrische Meßdaten über Größenänderungen von Kapillaren, Glia- und Ganglienzellen Auskunft über aktivitätsabhängige interzelluläre Wechselbeziehungen.

HILL (1950) wies am Riesenaxon von Sepia officinalis eine Volumenzunahme von $1,1 \times 10^3 \mu m^3/cm^2$ Membranfläche und Stimulationsimpuls infolge des vermehrten Na^+ -Einstroms während der Membrandepolarisation nach. Schon bevor die exakten quantitativen Beziehungen zwischen neuronaler Volumenänderung und Reizimpuls bekannt waren, galten Kerngrößenänderungen als Indikator veränderter Zellaktivität (BENNINGHOFF (1950): "Funktionelles Kernödem"; PUFF (1950): "Funktionelle Kernschwellung und Kernschrumpfung"; EICHNER (1952): "Arbeitshypertrophie"). Nach Entwicklung geeigneter mikrospektrographischer und autoradiographischer Techniken gelang es Proportionalitäten zwischen cytoplasmatischem Proteingehalt, nukleärer RNS-Konzentration und Kerngröße in verschiedenen Stadien zellulärer Ak-

tivität nachzuweisen (z.B. CASPERSSON, 1950, AMANO u.a. 1965; CINTOLER u.a., 1966). Die funktionsabhängigen nukleären und cytoplasmatischen Konzentrationen von Metaboliten des Nucleinsäure- sowie Proteinstoffwechsels bedingen unterschiedliche intrazelluläre osmotische Aktivitäten, die wiederum von Änderungen des zellulären Hydrationszustandes begleitet werden. Daraus resultieren phasenhafte Schwankungen des Zell- und Kernvolumens (Übersicht s. PALKOVITS, u. FISCHER, 1968). Diese Änderungen der zellulären Hydratation wirken sich auch auf die Mitochondrien aus, so daß Mitochondrien als "zelluläre Osmometer" (RUSKA, 1962) bezeichnet werden können. Somit kann das Ausmaß der Zellaktivierung durch Messung eines weiteren Parameters - z.B. der Mitochondriengröße - abgeschätzt werden (vgl. KORMAN u.a., 1970). Die vermehrte intrazelluläre Wassereinlagerung kann aber auch zum Indikator gestörter Membranfunktionen werden, wenn die Energieversorgung zur Aufrechterhaltung gerichteter transmembranöser Transportprozesse zusammenbricht. Fällt der Sauerstoffdruck im venösen Schenkel unter 19 - 17 torr, so treten erste zentralnervöse Funktionsstörungen auf (sog. "kritische Schwelle" vgl. OPITZ und SCHNEIDER, 1950), obwohl der effektive kritische mitochondriale pO_2 im Cortex bei 1 torr liegt (LÜBBERS, 1968). Der Zusammenbruch der Energieversorgung des Hirngewebes wirkt sich vor allem auf die Elemente aus, die am Aufbau der sog. "Blut-Hirn-Schranke" beteiligt sind - Kapillarendothelzellen und Astroglia. Als morphologische Kerzeichen gelten Schwellung der perikapillären Gliafortsätze und der Mitochondrien in Endothel- und Gliazellen (Übersicht s. HAGER, 1968). Durch Verbreiterung der Gliazellfortsätze von 0,63 μm im normalen auf 1,1 μm im ödematösen Gehirn (STRUCK und UMBACH, 1964) wird die Diffusionsstrecke zwischen Kapillare und Neuron beträchtlich verlängert und somit der Metabolitenaustausch weiter erschwert. Ein verhängnisvoller Kreisprozess beginnt. Ausmaß und Verlauf der genannten reaktiven Zellveränderungen können direkt an elektronenmikroskopischen Aufnahmen gemessen werden. Somit

lassen sich Wechselbeziehungen zwischen Nervenzell-Glia-Komplexen und zentralnervösem Kapillarkompartiment aus der Größenänderung folgender cytometrischer Parameter ableiten:

- 1) Kerngrößenänderung von Endothel-, Glia- und Ganglienzellen,
- 2) Änderung von Kapillarlänge und -abstand,
- 3) Durchmesseränderungen von Endothel- und Glialamellen im Bereich der "Blut-Hirn-Schranke",
- 4) Durchmesseränderung von Mitochondrien in Endothel- bzw. Gliazellen im Bereich der "Blut-Hirn-Schranke".

Als weitere Parameter zur Charakterisierung des Reaktionsvermögens Peptidhormone bildender Neurone werden mikrospektrographische Messungen des zellulären Nucleinsäure- und Proteingehalts herangezogen.

Um aus den gewonnenen Meßwerten auf Wechselbeziehungen zwischen Neuron-Glia-Komplexen und benachbarten Kapillaren zu schließen, muß nach einer Möglichkeit der Systemanalyse gesucht werden, mit der man Abhängigkeiten zwischen einer Vielzahl von Variablen beschreiben kann. Hierfür eignet sich die Theorie der Graphen, die Beziehungen (Relationen) zwischen Systemkomponenten eines Organsystems in Form eines topologischen Strukturmodells darstellt und somit seinen Organisationsplan charakterisiert (RASHEVSKY, 1954; ROSEN, 1958). Die graphentheoretische Untersuchung des Zusammenspiels von Systemelementen läßt sich auf drei Ebenen unterschiedlicher Komplexität durchführen:

- 1) Beschreibung der intrazellulären Wechselbeziehungen zwischen Stoffwechselprozessen und ihrem morphologischen Korrelat.
- 2) Beschreibung von interzellulären Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen Zelltypen, die funktionell zu Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexen zusammengeschlossen sind.
- 3) Beschreibung von interzellulären Wechselbeziehungen zwischen räumlich getrennten Zellverbänden, die jedoch durch Regelkreise miteinander verknüpft sind.

2. Material und Methoden

Die genannten drei Typen von intra- und interzellulären Wechselbeziehungen ließen sich im eigenen Material nicht an einem einzigen Modell studieren; die entsprechenden Untersuchungen wurden deshalb an drei geeigneten Versuchsobjekten durchgeführt:

- 1) Um Vergleichswerte der cytometrischen Parameter (Zellkernfläche und Kapillarlänge bzw. -abstand) zur Abgrenzung von physiologischen und pathologischen Reaktionen zu erhalten, wurden Motoneurone des Gastrocnemius-Kerns von Albinoratten durch definierte und kontrollierte antidrome 8 stündige Dauerreizung (Reizfrequenz 1 Hz, Reizdauer 0,1 msec, Reizstärke supramaximal zur Depolarisation von Motoneuronen) über die linken Nn. gastrocnemii aktiviert.
- 2) Wechselbeziehungen zwischen Zellkomplexen aus peptidergen Neuronen mit ihrer Hüllglia und dem cerebralen Kapillarkompartiment wurden am Oberschlundganglion (OSG) von Lumbricus terrestris nach spezifischer Aktivierung seiner Neurohormonproduktion im Dehydrations-Experiment untersucht. Am gleichen Modell wurden auch die quantifizierbaren Reaktionen der peripheren Zielorgane auf den hormonellen Stimulus studiert. Das funktionelle Zusammenspiel von Perikapillar-, Glia- und Ganglienzellen des OSG war schon in Vorstudien am Regenerat nach Elektrokoagulation einer Hemisphäre des OSG getestet worden. (Die regenerationsbedingte Aktivierung der peptidergen sekretorischen Neurone in der unverletzten Hälfte des OSG wird von einer Zunahme des gleichseitigen Kapillarkompartiments und einem vollständigen Abbau der Glykogendepots in den perineuronalen Gliazellen begleitet; s. ZIMMERMANN, 1970 a).
- 3) Eine pathologische Entgleisung der Reaktionen von Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexen sowie der Wechselbeziehungen zwischen räumlich getrennten Verbänden dieser Zelltypen ließ sich am standardisierbaren Modell des kälteinduzierten Hirnödems (linksparietaler Cortex

von Kaninchen) verfolgen. Dabei wurden die Zellreaktionen in der traumatisierten Zone und im korrespondierenden gegenseitigen Cortexareal verglichen.

Materialgewinnung, Fixierung und Färbung erfolgten nach standardisierten Verfahren (s. ZIMMERMANN, 1967). Die Messungen des Nucleinsäure- und Proteingehalts von peptidergen Neuronen des Oberschlundganglions wurden an nativen, im wasserfreien Glycerin (MERCK) hergestellten Einzelzellpräparaten mit dem Mikrospektralphotometer MS 1206 (BECKMAN, München) im Doppelstrahlverfahren durchgeführt. Für die quantitative Auswertung der histologischen Präparate standen das Stichprobenmikroskop (WILD, Heerbrugg) und eine in Zusammenarbeit mit der Fa. LEITZ (Wetzlar) entwickelte Projektionseinrichtung für elektronenmikroskopische Negative zur Verfügung. Zur elektronenmikroskopischen Technik s. ZIMMERMANN, (1970 b; im Druck). Zur Kerngrößenbestimmung wurden zwei Verfahren der Kernflächenmessung (A_N) angewandt: a) die Punktzählplanimetrie für kleine Zellkerne $A_N = P_A \times d^2 (\mu m^2)$ (d = Rasterpunkt Abstand) und b) der Vergleich des Zellkernanschnitts mit genormten Kreisflächen für große Zellkerne (FISCHMEISTER, 1967). Nach Trichromfärbung (s.o.) wurden Zellkerne mit deutlichem Nucleolus und hellem Nucleoplasma sowie randständig kondensiertem Chromatin als Ganglienzellen abgegrenzt. Diese Definition schränkt die Auswertung von zufällig verteilten Kernanschnitten ein; daher muß zur Kerngrößenklassifizierung nachgewiesen werden, daß a) Kernanschnitte mit Nucleolus Äquatorialschnitte sind und b) unter Stimulation die Exzentrizität des Nucleolus konstant bleibt. Die zulässige Exzentrizität, nach der ein Nucleolus noch als zentral gelegen gilt, hängt von der erstrebten Meßgenauigkeit und dem Kerndurchmesser ab (s. ZIMMERMANN u.a., 1973). Von 100 α -Motoneuronen (mittlerer Kerndurchmesser: $17 \mu m$) in den Segmenten L_6-S_1 von Albinoratten zeichnen sich 6 durch einen Nucleolus aus, der mehr als $5 \mu m$ vom Kern-

mittelpunkt entfernt ist; letztere liegen somit außerhalb des Grenzwertes, der zur Erzielung einer 95 %igen Meßgenauigkeit der Kernfläche nötig ist (Abb. 1a). In der gleichen Versuchsserie wurde gezeigt, daß sich die Exzentrizität des Nucleolus auch unter Stimulation nicht ändert (Abb. 1 a -c).

Die Kapillarlänge (L_{VC}) ließ sich aus der Anzahl der erythrozytengefüllten Kapillardurchtritte (P_A) durch die Einheitsmeßflächen errechnen.

$$L_{VC} = 2 P_A (\text{mm/mm}^3) \text{ (SMITH und GUTTMAN, 1953).}$$

Eine Änderung der cerebralen Kapillarperfusion ist über zwei Wege denkbar: 1) Nach FORBES und COBB (1938) werden die cerebralen Kapillaren dauernd durchströmt, d.h. "zeitweilig verschlossene Reservekapillaren fehlen". Demnach hängt eine Änderung der lokalen Hirndurchblutung nur von Schwankungen der intrakapillären Erythrozytenkonzentration ab und nicht von der Eröffnung vorher geschlossener Kapillaren. 2) OPITZ und SCHNEIDER (1950) schließen hingegen die Eröffnung zeitweilig kollabierter Kapillarabschnitte nicht aus und verweisen auf die Untersuchungen von COBB und TALBOTT (1927), die über eine signifikante Zunahme der Kapillaren im Lobus olfactorius nach Einatmen von Ammoniakdämpfen berichten. In beiden Fällen kann die "erythrozytengefüllte Kapillarstrecke" als Relativmaß für die Kapillardurchblutung gelten.

Die Schichtdicke von kapillären Endothelzellen und angrenzenden Glialamellen im Bereich der "Blut-Hirn-Schranke" sowie der Durchmesser von Mitochondrien wurden direkt am projizierten Negativ nach vorheriger Eichung der Vergrößerung (Polaron grating replicon, LWU, München) gemessen.

Auf Bestimmungen weiterer Parameter wurde bewußt verzichtet, da 1) die gemessenen Parameter zur cytometrischen Charakterisierung zellulärer Aktivitätsschwankungen ausreichen wie im Prinzip auch andere Untersuchungen gezeigt haben (vgl. S.5-7). 2) Eine vollständige morphometrische Analyse des Strukturaufbaus (vgl. WEIBEL und ELIAS, 1967) von Nervenzell-Glia-Komplexen würde zwar mehr Datenmaterial liefern, jedoch wäre

der Gewinn an neuer Information über die funktionelle Organisation dieses Zellverbandes zweifelhaft, da die oben aufgeführten Zellparameter besonders empfindlich und ausgeprägt auf Stoffwechseländerungen reagieren. Eine gezielte Auswahl der Meßparameter wurde daher aus Gründen der Zeitökonomie getroffen.

Nachdem in Vorversuchen die Anzahl der notwendigen Messungen pro Parameter ermittelt worden waren (vgl. Abb. 2,3,4), wurde die statistische Bearbeitung der Meßwerte nach folgendem Schema durchgeführt:

1) Überprüfung der Normalverteilung mit Wahrscheinlichkeitsnetz. Hierbei wurde darauf geachtet, daß die Meßwerte aufeinanderfolgender Zeitintervalle ebenfalls normalverteilt blieben (vgl. Abb. 5 a mit b). 2) Um Abweichungen der Mittelwerte der Einzeltiere eines Kollektivs festzustellen, wurde der varianzanalytische Vergleich mehrerer Mittelwerte mit Hilfe der F-Verteilung ($\alpha = 0,05$) angewandt. Weitere Angaben zur Statistik s.u. Material und Methoden der Einzelarbeiten. Die gewonnenen Meßwerte wurden zum Studium der Wechselbeziehungen zwischen Endothel-, Nerven- und Gliazellen graphentheoretisch weiter bearbeitet; hierfür sind folgende Definitionen von Bedeutung (Übersicht bei LAUE, 1970): Ein System ist durch die Menge seiner Elemente und die Menge der Relationen (Beziehungen) zwischen den Elementen gekennzeichnet. Diese Zusammenhänge lassen sich in Form von Graphen beschreiben, wenn man die Elemente, die z.B. meßbare Änderungen von Zellfunktionen sein können, als Punkte und die Relationen zwischen den Elementen als Kanten darstellt. Aus dem Grad (g) der Verknüpfung, d.h. der Anzahl von Kanten, die auf ein Element konvergieren, kann die Bedeutung dieser Systemkomponente im Gesamtsystem beurteilt werden. Außerdem erleichtert die graphentheoretische Strukturanalyse die Suche nach Regelkreisen; letztere werden als Punktmenge dargestellt, die durch gleichgerichtete Kanten miteinander verknüpft sind; in einem Punkt erfolgt der Kreisschluß, hier beginnt und endet die Kantenfolge, die die Punktmenge verbindet (Zyklus). Die

Bedeutung des Graphen als Strukturmodell des untersuchten biologischen Systems läßt sich noch steigern, wenn die Relationen zwischen den Elementen auf Grund von Meßreihen quantitativ erfaßt werden. Dies wird in den vorliegenden Studien durch Errechnung der Korrelationskoeffizienten zwischen den relativen Größenänderungen (Kontrollwert = 100 %) der paarweise zugeordneten cytologischen Parameter erreicht. Der Wert des Korrelationskoeffizienten gilt als Maß für die Stärke der Kopplung zwischen den Funktionsänderungen zweier Systemelemente. Somit bildet der Graph, dessen Kanten aus signifikanten Korrelationen besteht, nicht nur die Struktur sondern auch die Funktionen des Originals ab.

3.Theoretische Überlegungen und Synopsis der Ergebnisse

3. Eigene Befunde

In eigenen Modelluntersuchungen über Wechselbeziehungen zwischen Nervenzell-Glia-Komplexen und dem cerebralen Gefäßsystem wurden Zellreaktionen mit der folgenden Zielsetzung cytometrisch erfaßt: 1) Um subjektive Einflüsse beim Vergleich der cytologischen Befunde verschiedener Versuchsserien und -modelle zu reduzieren. 2) Um cytologische Befunde korrelationstatistisch zu bearbeiten, so daß aus den entsprechenden korrelativ verknüpften Meßwertänderungen auf funktionelle Zusammenhänge geschlossen werden kann. 3) Um die nach 2. bearbeiteten Ergebnisse graphentheoretisch zu analysieren, so daß die strukturelle und funktionelle Organisation der Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexe eindeutig beschrieben werden kann.

3.1. Graphentheoretische Untersuchungen der funktionellen Kerngrößenänderung von Nervenzellen.

Die Cytometrie von unterschiedlichen Funktionszuständen solcher Zellkomplexe basiert auf der Messung von Kompartimentanteilen stoffwechselaktiver Zellorganellen (z.B. Zellkerne, Mitochondrien) und hängt somit von den Beziehungen zwischen Zellfunktion, intrazellulärer Metabolitenkonzentration und Hydrationszustand ab. Diese Zusammenhänge sollen an Nervenzellen am Beispiel der funktionellen Kerngrößenänderungen (vgl. BENNINGHOFF, 1950) graphentheoretisch untersucht werden. Der Strukturgraph (Abb. 6) vereinigt in einem hypothetischen Modell die Beziehungen zwischen den wichtigsten Stoffwechselprozessen eines cholinergen und zugleich sekretorischen (endokrin aktiven) Neurons nach Stimulation. Der Reiz (R) wird durch Membrandepolarisation (MD_p) beantwortet. Die Primärreaktion (-.-.) des Neurons auf den Stimulus bewirkt über den vermehrten Na^+ -Einstrom eine Zunahme der intrazellulären osmotischen Aktivität (π). Zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts muß Wasser in die Zelle diffundieren; die intrazelluläre Hydratation

(H_e) steigt, und das Cytoplasma- bzw. Kernvolumen nimmt zu (V_z) (vgl. HILL, 1950). Isoosmolarität zwischen Kern- und Cytoplasma sowie der niedrige elektrische nukleäre Membranwiderstand sprechen für einen freien Austausch von Wasser und Elektrolyten durch die Kernmembran (BEST und TAYLOR, 1966). Auch für "Mono- und Disaccharide, Aminosäuren sowie freie Nucleotide scheint die Kernhülle frei permeabel zu sein, denn man findet keine Konzentrationsunterschiede zum Hyaloplasma. Für viele Stoffwechselwege, z.B. die Glykolyse, könnte man daher Kernraum und Hyaloplasma als einen einheitlichen funktionellen Raum ansehen" (HELDT, 1972). Ein Metabolitenaustausch ist wahrscheinlich über die 1000 - 10000 Poren pro Kern möglich (BEST und TAYLOR, 1966) und rechtfertigt die Annahme einer gleichgerichteten Volumenänderung von Kern- und Cytoplasma durch intrazelluläre Konzentrationsänderungen von Wasser und Elektrolyten.

Eine weitere Reaktionsmöglichkeit der Ganglienzelle auf Reizung besteht in der Freisetzung von Transmittersubstanzen (T_f) oder in der Hormonsekretion (H_s). Die Hormonfreisetzung kann hingegen als echter Substanzverlust des Cytoplasmas angesehen werden und bewirkt somit eine Verkleinerung des Cytoplasmavolumens (vgl. PALKOVITS und FISCHER, 1968). Der Vergleich zwischen Primär- und Folgereaktion (Transmitter- oder Hormonabgabe) zeigt, daß die neuronale Reizbeantwortung zu unterschiedlichen intrazellulären Hydrationszuständen führen kann. Die entsprechende Kerngrößenänderung hängt von der Art der Zellreaktion (einfache Depolarisation oder Transmitter- bzw. Hormonfreisetzung) und dem Beobachtungszeitraum ab. Während die Elektrolytverschiebungen der Membrandepolarisation in msec. ablaufen und für etwa 20 % der Volumenänderung des Cytoplasmas in Frage kommen (HILL, 1950), halten die komplexeren Vorgänge der Hormonsekretion über Minuten an (vgl. SACHS u.a., 1967) und führen infolge des größeren Substanzverlustes zu stärkeren Änderungen

des Zellvolumens (PALKOVITS und FISCHER, 1968).

Im Verlauf der Langzeitstimulation wird der Verlust von Transmitter- und Neurosekretprodukten durch Neusynthese ersetzt. Die reizbedingte Membrandepolarisation leitet über die Stimulation der nucleären bzw. cytoplasmatischen RNS-Synthese (RNS) die zelluläre Proteinsynthese (P_s) ein (vgl. HYDÉN, 1967). Diese Syntheseprozesse sind energieabhängig und daher mit dem neuronalen Glucosemetabolismus sowie mit der oxydativen Phosphorylierung gekoppelt. Die Reaktionskette beginnt mit der Glucoseaufnahme und führt über die verschiedenen Stufen des Glucoseabbaus zur Synthese von energiereichen Verbindungen (z.B. ATP). Da Glykogen im ZNS in der Regel nicht als Reservkohlenhydrat verwendet wird (ABOOD und GEIGER, 1955), erfolgt die Erhöhung der intrazellulären osmotischen Aktivität über die gesteigerte Glucoseaufnahme (Gluc) und die Glucoseabbauprodukte. Außerdem müssen zur Transmitter- bzw. Hormonsynthese Aminosäuren aktiviert werden, die entweder durch zelleigenen Proteinabbau oder durch vermehrten transmembranösen Transport und aus dem Glucosestoffwechsel (GEIGER, 1958) dem Neuron zur Verfügung stehen. Während aus diesen Stoffwechselprozessen eine Erhöhung der intrazellulären osmotischen Aktivität resultiert (FLORKIN und SCHOFFENIELS, 1965), verliert die Zelle durch Synthese der hochmolekularen Metaboliten - RNS, Proteine, Peptide - osmotisch wirksame Moleküle. Die erwartete Abnahme der Zell- oder Kerngröße kann jedoch durch Speicherung der neusynthetisierten Neurohormone kompensiert werden. Überwiegt die Abgabe von Transmitter- oder Hormonsubstanzen, so beobachtet man erst dann eine Zell- oder Kernverkleinerung, wenn die Prozesse zur Energiebereitstellung für die Neusynthese (Zunahme der zellulären Hydratation) durch die Sekretabgabe überspielt werden.

Somit zeigt die Darstellung der Wechselbeziehungen zwischen intra-

zellulären neuronalen Stoffwechselprozessen in Form eines Graphen, daß die funktionsbedingten Kerngrößenänderungen von einem komplizierten System miteinander vermaschter Kreisprozesse abhängen. Phasenhafte Kerngrößenschwankungen lassen sich mit a) einem zeitweiligen Überwiegen des Metabolismus der Energiebereitstellung, b) der Hormon- bzw. Transmittersynthese und -speicherung sowie c) einer vermehrten Abgabe von Neurohormonen und -transmittern erklären. Weiterhin geht aus dem Graphen hervor, daß alle Schritte, die zu langanhaltenden Änderungen des Stoffwechsels und damit der Zellkerngröße führen, eng mit der Synthese und dem Verbrauch energiereicher Verbindungen verknüpft sind (ATP_V : Verknüpfungsgrad $g = 12$). Dies stimmt mit den Untersuchungen von BÜCHER und KLINGENBERG (1958) überein, die beweisen, daß das Adenylsäuresystem einen wirkungsvollen Stabilisierungsmechanismus des Zellmetabolismus mit geringer Schwankungsbreite darstellt. Auch unter extremen Versuchsbedingungen trägt die Kontrollstärke des ATP-ADP-Systems zur Stabilisierung des Glykolyseabbauweges bei (PALETTA, 1970). Dies ist ein wichtiger Grund zur Erklärung des beobachteten hohen Dämpfungsgrades, den der Einschwingvorgang der Kerngrößenänderung nach Stimulation der entsprechenden Neurone zeigt (vgl. DRISCHEL, 1956).

Aus dem Maximalwert der Kerngrößenänderung kann man schließen, ob diese stimulationsbedingt ist oder auf pathologischen Störungen des Membrantransports beruht. Die 8stündige antidrome Aktivierung der Gastrocnemius-Motoneurone der Albinoratte kann als Modell einer extremen funktionellen Dauerbelastung von Ganglienzellen angesehen werden. Die Bestimmung der Kerngröße dieser Motoneurone in einstündigen Abständen führt zu Maximalwerten der Kernflächenänderung von 10 - 15 %. Diese unter standardisierten Reizbedingungen erzielten maximalen Kerngrößenänderungen dienen in einer weiteren Versuchsserie - dem kälteinduzierten Hirnödem - als Vergleichswerte zur Unterscheidung zwischen der pathologischen Reaktion von Neuronen in der Läsionszone und

der ödem- bzw. nekrosebedingten Reizantwort von Neuronen im korrespondierenden kontralateralen Cortexabschnitt. Die Gegenüberstellung der Kerngrößenänderung von Ganglienzellen aus korrespondierenden Abschnitten des Stratum granulosum externum der rechten und linken - traumatisierten - Hemisphäre zeigt, daß die funktionelle Aktivierung der Neurone im rechtsseitigen Cortex ebenfalls nur zu etwa 10 %igen Kernvergrößerungen führt, während in der direkten Läsionszone eine maximale Kernflächenänderung von 40 % beobachtet wird (Abb. 7). Der Ausmaß der Aktivierbarkeit von Ganglienzellen, gemessen an ihrer maximalen Kerngrößenänderung, ist somit begrenzt. Diese Begrenzung hängt einmal von den obengenannten metabolischen Eigenschaften des Neurons ab, andererseits aber von den Wechselbeziehungen innerhalb der Funktionseinheit aus Neuron, Glia und Endothelzelle.

3.2. Graphentheoretische Untersuchungen der Wechselbeziehungen innerhalb des Endothel- Glia-Nervenzell-Komplexes.

Zunächst soll der allgemeine Strukturgraph von Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexen besprochen werden. In der allgemeinsten Form entsteht dieser Graph aus der Hintereinanderschaltung zweier Zyklen (Abb. 8a), wobei den Elementen E_2 (Gliazellen) die zentrale Vermittlerrolle zwischen reizverarbeitenden Elementen (R ; E_3 -Ganglienzellen) und Elementen mit nutritiver Funktion (E_1 -Endothelzellen, M_{abs} -Metabolitenabsorption, M_{ex} -Metabolitenexkretion) zukommt. Damit ist dieser Zellkomplex zur Selbsterhaltung befähigt, denn nach Noack (1968) müssen mindestens zwei Zyklen in einem System vorhanden sein, damit es als lebendes System bezeichnet werden kann. Eine weitere Aufschlüsselung der wichtigsten biologischen Funktionen der miteinander zyklisch verbundenen Endothel-, Glia- und Nervenzellen führt zu Graphen niedriger Abstraktionsstufe. Abb. 8 b demonstriert den Aufbau des Strukturgraphen, der den Metabolitenfluß durch Endothel- und Gliazellen beschreibt. Als M_{ex} diffundieren CO_2 und Harn-

stoff (Hst_b) in Richtung auf das Kapillarlumen, während Glucose- und Aminosäuretransport (M_{abs} : $Gluc_{Tr}$ und AS_{Tr}) zum Neuron hin verlaufen ($Gluc_N$, AS_N). Die beiden letztgenannten Zellfunktionen sind die interzellulären Kopplungsglieder, über die der Stoffwechsel der Endothel-Glia-Nervenzellkomplexe koordiniert wird. Als zentrales Stabilisierungselement erscheint wieder das ATP-ADP-System (s.o.), gekennzeichnet durch den höchsten Verknüpfungsgrad ($g = 9$) und die meisten Ausgangsrelationen (8). Die spezifische reizverarbeitende Funktion der Neurone kommt im Strukturgraphen der Abb. 8 c zur Geltung: Da die Nervenzelle Ziel des gerichteten transzellulären Glucose- und Aminosäuretransports im Endothel-Glia-Nervenzellverband ist, verlieren die Elemente (AS_{Tr}) und ($Gluc_{Tr}$) eine Ausgangsrelation; demgegenüber steigt der Verknüpfungsgrad der Elemente (ATP_V) und (AS_a) durch die reizbedingte Aktivierung synaptischer Membranprozesse.

Die abgebildeten Strukturgraphen der intra- und interzellulären Wechselbeziehungen in Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexen verdeutlichen die starke Vernetzung der Regelvorgänge und zeigen damit die Schwierigkeiten, die der vollständigen Analyse des komplizierten Regelkreises entgegenstehen. Eine isolierte Untersuchung von Einzelfunktionen ist meist nicht möglich. Jedoch läßt sich durch die Messung von Parametern, die als Indikatoren mehrerer voneinander abhängiger Zellfunktionen gelten, eine vereinfachte Beschreibung der Systemorganisation durchführen, ohne daß ein schwerwiegender Verlust von Informationen eintritt. Als solche Indikatoren können bestimmte cytometrische Parameter wie z.B. Zellkerngröße, die Länge der erythrozytengefüllten Kapillarstrecke, der Mitochondriendurchmesser bzw. biochemische Parameter wie z.B. Nucleinsäure- und Proteinkonzentration angesehen werden (s.o.). Ausmaß und Richtung der zeitabhängigen Änderung der genannten Parameterwerte sollen in den folgenden drei Versuchsserien Auskunft über die Entwicklung funktioneller Wechselbeziehungen zwischen cerebralem Kapillarbett (Endothelzellen) und

Nervenzell-Glia-Komplexen geben.

3.3. Untersuchungen über Wechselbeziehungen zwischen Neuronen und dem cerebralen Kapillarsystem am Modell der antidromen Langzeitstimulation von Vorderhornneuronen der Albinoratte.

Die von E. SCHARRER (1937) klassifizierten topographischen Beziehungen zwischen Nervenzellen und Kapillaren (s.S.5) beobachtet man auch am Rückenmark der Ratte. Die graphische Rekonstruktion von Querschnittserien aus dem Lumbalmark ergibt (Abb. 9): Große Neurone mit Kernflächen $> 150 \mu\text{m}^2$ zeichnen sich durch mehrfachen engen Kontakt mit netzförmig verzweigten Kapillaren aus ($\uparrow_1$), während kleine Ganglienzellen (Kernfläche $< 150 \mu\text{m}^2$) meist perivaskulär angeordnet sind ($\uparrow_2$). Daneben erkennt man sowohl Areale mit relativ dicht gepackten kleinen Neuronen ($\uparrow_3$) als auch mit vermehrten Kapillaranschnitten ohne entsprechende Zunahme von perikapillären Neuronen ($\uparrow_4$). Diese Mißverhältnisse der letztgenannten Gefäß-Nervenzell-Beziehungen gleichen sich im Verlauf der antidromen Langzeitstimulation von α -Motoneuronen des Gastrocnemius-Kerns aus.

Durch eine 8stündige Dauerstimulation über den linken medialen und lateralen N. gastrocnemius läßt sich eine allmähliche und gezielte Synchronisation der neuronalen Aktivität im entsprechenden motorischen Kerngebiet erreichen. Die zunehmende Rekrutierung von Neuronen führt zu einem Sauerstoffmehrverbrauch in den aktivierten Rückenmarksabschnitten. Die Gewebedurchblutung steigt, sichtbar an der allmählichen Zunahme der erythrozytengefüllten Kapillarstrecke in der linksseitigen Vorderhornregion der Segmente L_6-S_1 (ZIMMERMANN u. a., 1973; Abb. 6). Die Umzeichnung der erythrozytengefüllten Gefäßanschnitte in diesem Areal zeigt, daß nach 7stündiger Stimulation die durchströmten Kapillarstrecken besonders in den Neuropilzonen zunehmen, in denen die Komplexe kleiner Neurone ohne direkte Gefäßbeziehung liegen (ZIMMERMANN u. a., 1973; Abb. 7). Die getrennte Bestimmung der Korrelationskoeffizienten aus den Ände-

rungen der Kapillarlänge und der Kernfläche von großen bzw. kleinen Vorderhornneuronen (Grenzwert der Kernfläche $150 \mu\text{m}^2$; s. Abb. 10) in aufeinanderfolgenden einstündigen Intervallen ergibt, daß die Mehrdurchblutung in der ersten Phase (1. - 3. Std.) von der Aktivität der antidrom gereizten Motoneurone (Kernfläche $> 150 \mu\text{m}^2$), in der zweiten Phase (5. - 7. Std.) von transsynaptisch stimulierten Interneuronen (Kernfläche $< 150 \mu\text{m}^2$) abhängt (ZIMMERMANN u.a., 1973; Abb. 5).

Eine genaue Aufschlüsselung der beobachteten neuronalen Zellkernreaktionen auf die Dauerstimulation ergibt eine 10 - 15 %ige Abnahme der Kernfläche antidrom gereizter Motoneurone in den ipsilateralen Segmenten $L_6 - S_1$ innerhalb der ersten Phase des Experiments. Gleichzeitig erfolgt über Axonkollateralen der stimulierten Gastrocnemius-Motoneurone eine ipsilaterale transsynaptische Aktivierung kleinkerniger Interneurone (Kernfläche: etwa $40 \mu\text{m}^2$). In der zweiten Phase werden ipsi- und kontralaterale Interneurone mit größerer Kernfläche ($50 - 70 \mu\text{m}^2$) in die Reizausbreitung einbezogen. Erst nach 7stündiger Reizung sprechen auch große Neurone (Kernfläche $> 150 \mu\text{m}^2$) an, die kontralateral zu der direkt stimulierten Rückenmarkshälfte liegen.

Während der Langzeitstimulation führt die fortlaufende Messung von Kernfläche und erythrozytengefüllter Kapillarstrecke im gleichen Gewebsareal zu Grenzwerten, die als Maßzahlen für den cytometrisch faßbaren maximalen Aktivierungsgrad von Ganglienzellen und die größtmögliche Anpassungsfähigkeit der lokalen Hirndurchblutung an den erhöhten Sauerstoff- und Metabolitenbedarf gelten können. Danach beobachtet man eine 10 - 15 %ige Abnahme der Kernfläche antidrom gereizter Motoneurone bei einer gleichzeitigen Verlängerung der erythrozytengefüllten Kapillarstrecke von $350 \text{ mm}/\text{min}^3$ auf $800 \text{ mm}/\text{min}^3$.

Die Kenntnis dieser Grenzwerte ist wichtig auch für die Beurteilung der Reaktionslage von Neuronen bzw. Endothel- Glia-Nervenzellkomplexen in den unter (2) und (3) geschilderten Experimenten.

3.4. Untersuchungen über Wechselbeziehungen zwischen Nervenzell-Glia-Komplexen und cerebralem Kapillarsystem am Modell der neuroendokrinen Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushalts bei Lumbricus terrestris L.

Wie bereits geschildert liegen im bilateral symmetrisch gebauten Oberschlundganglion von Lumbricus terrestris peptiderge und aminerge sekretorische Neurone sowie nicht sekretorische Ganglienzellen mit ihrer Hüllglia in einer dichten Formation. Die Zellschicht zwischen Neurilemm und zentral gelegenem Neuropil kann nach cytoarchitektonischen Gesichtspunkten in drei Areale unterteilt werden (ZIMMERMANN, 1970 a):

- 1) Areal I: "Gomori-positive" (peptiderge) Neurone überwiegen.
- 2) Areal II : "Gomori-negative" Neurone dominieren.
- 3) Areal III : Ependymähnliche Faserglia steht im Vordergrund. Auch die Dichte des Kapillarbettts variiert in diesen drei Arealen: Während man im Areal I (Gebiet der "Gomori-positiven" Neurone) und im Areal III etwa gleichhohe Werte der Kapillarlänge um 3000 mm/mm^3 beobachtet, sind im Areal II nur Werte um 1500 mm/mm^3 meßbar. (Abb. 12, S.61). Diese hohe Kapillardichte weist auf die doppelte Funktion des Gefäßsystems im Gebiet sekretorisch aktiver Neurone hin; es dient neben dem Sauerstoff- und Metabolitentransport der Aufnahme von Neurohormonen, die über den Kreislauf zu ihrem Zielorgan gelangen. Im Oberschlundganglion von Lumbriciden wird das Neurosekret wahrscheinlich in Kapillarschlingen abgegeben, die in der Neurosekret-Depotzone liegen und in das cerebrale Kapillarnetz münden.

Die speziellen Beziehungen zwischen Kapillaren und sekretorisch aktiven Neuronen werden durch die gerichtete Verteilung von Mitochondrien und Zisternen des endoplasmatischen Reticulums in den Komplexen aus Perikapillar-, Glia- und Ganglienzellen belegt (In Ka-

pillaren des Regenwurms fehlt die Endothelzellauskleidung. Perikapillär angeordnete Zellen mesodermalen Ursprungs übernehmen die Funktion von Endothelzellen). In der direkten Kontaktzone zwischen Perikapillar- und Gliazellen sammeln sich Mitochondrien und Zisternen des endoplasmatischen Reticulums der beiden Zelltypen in unterschiedlichen Vorzugsrichtungen an. Demgegenüber beobachtet man im Kontaktbereich zwischen Ganglienzellen und ihrer Hüllglia eine Häufung dieser Zellorganellen in gleichen Quadranten des perikapillären Areals. Die Ansammlung von Mitochondrien und Zisternen des ER in benachbarten Cytoplasmaarealen von funktionell gekoppelten Zellelementen wird als Hinweis auf gerichtete Wechselbeziehungen zwischen den einzelnen komplexbildenden Zelltypen gedeutet. Eine ähnliche funktionsabhängige Verteilung von Mitochondrien konnte durch elektronenmikroskopisch-cytometrische Analyse auch an den Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexen im Nucleus infundibularis der Maus nachgewiesen werden (OKSCHE u.a., 1972). Die räumliche Ausrichtung von stoffwechselaktiven Zellorganellen zur Grenzfläche zwischen voneinander abhängigen Zellsystemen dient der "Minimalisierung der Diffusionsstrecken" für den Metabolitenaustausch (ZIMMERMANN, 1970 b).

Nach der geschilderten Untersuchung des Bauplans von Perikapillar-Glia-Nervenzell-Komplexen im Oberschlundganglion von Lumbricus terrestris wurden in einem Stimulationsexperiment mit der gleichen cytometrischen Technik die funktionellen Wechselbeziehungen zwischen diesen drei Zelltypen studiert. KAMEMOTO (1964) konnte im Exstirpationsversuch nachweisen, daß bei Lumbriciden die zentrale Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts im Oberschlundganglion lokalisiert ist. AROS und BODNAR (1960) sowie OTREMBA (1961) beobachteten eine Aktivitätssteigerung "Gomori-

Um die funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen Aktivitätsphasen der aus peptidergen Neuronenkomplexen bestehenden Einheiten und ihrem spezifischen Kapillargebiet zu klären, wurden die zeitabhängigen Reaktionen der vermuteten peripheren Zielorgane der Neurohormone - Nephridien, Darm, Integument - im gleichen Experiment cytometrisch untersucht. Durch Berechnung der Korrelationskoeffizienten aus den Änderungen der paarweise geordneten Meßwerte und Darstellung der korrelativen Wechselbeziehungen in Form von Graphen ergibt sich folgender Organisationsplan (ZIMMERMANN, 1973; Abb. 7): In den ersten 30 min. nach Beginn des Dehydrationsexperiments steht der nephridiale Zilienkanal im Mittelpunkt der neuroendokrinen Gegenregulation. Die Meßwertänderungen des Zilienkanals sind über sechs signifikante Korrelationen mit denen anderer Komponenten (d.h. mit den Änderungen der Extinktionswerte in den "Gomori-positiven" Neuronen des Oberschlundganglions, des Volumenanteils der Stützzellen der Epidermis und der Kerngröße von Darmepithelzellen) verbunden. Der Zilienkanal besitzt den höchsten Verknüpfungsgrad ($g = 6$), wobei vier Korrelationen zu den Extinktionsänderungen der peptidergen Neurone im Oberschlundganglion bestehen. Die anfängliche Dominanz des Zilienkanals wird im 30- 60 min-Intervall von der zunehmenden Aktivierung des Stäbchenkanals abgelöst, der immer stärker unter den Einfluß der peptidergen Neurone gerät. Während in den ersten 30 min. nur eine signifikante Korrelation zwischen der Reaktion des Stäbchenkanals und der cerebralen Neuronenaktivierung nachweisbar ist, beobachtet man in späteren Phasen die maximal mögliche Anzahl von 4 Korrelationen. Auch die Zahl signifikanter korrelativer Verknüpfungen mit den reaktiven Kerngrößenänderungen von Darmepithel- und Epidermiszellen nimmt im Verlauf des Dehydrationsexperiments zu. Durch die permanente Stimulation stabilisiert sich das System, das den

Wasser- und Elektrolythaushalt von Lumbricus terrestris kontrolliert, indem eine zunehmende Integration der einzelnen Funktionseinheiten - Nephridien, Darm, Integument - unter dem neuroendokrinen Einfluß des Oberschlundganglions erfolgt.

3.5. Untersuchungen über Wechselbeziehungen zwischen Nervenzell-Glia-Komplexen und cerebralem Kapillarsystem am Modell des kälteinduzierten Hirnödems beim Kaninchen.

Neben der funktionsabhängigen Größenschwankung von Zellkompartimenten beobachtet man Änderungen der Kern-, Cytoplasma- und Mitochondriengröße, die auf Störungen des Membrantransports beruhen. Die Auswirkungen der Membranstörung auf die Entwicklung von Wechselbeziehungen zwischen Endothel-, Glia- und Nervenzellen wurde am kälteinduzierten Hirnödem studiert.

Durch Einwirkung von flüssigem Stickstoff auf das linke Os parietale des Kaninchens wird der darunterliegende Cortexabschnitt direkt geschädigt; von hier aus entwickelt sich bei geschlossener Kalotte ein reproduzierbares Hirnödem. Die Reaktion von kältegeschädigten Zellverbänden in der Läsionszone wird mit dem Verhalten von Endothel-, Glia- und Nervenzellen in den korrespondierenden rechtsseitigen Rindenschichten I. und II. verglichen. Außerdem werden Untersuchungen der Blutgerinnung zur Beurteilung der gestörten Wechselbeziehung zwischen Gefäßsystem und den abhängigen Gewebsbezirken herangezogen.

30 min. nach der Läsion reagieren Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexe der Rindenschicht II. im traumatisierten Cortex-Areal mit einer Zunahme ihrer Kerngröße, während im entsprechenden Hirn-

areal der Gegenseite neben den initialen Abnahme der Kapillarlänge nur eine Kernvergrößerung von Endothelzellen meßbar ist. Jedoch spricht die an elektronenmikroskopischen Aufnahmen gemessene Zunahme (Verbreiterung) der Durchmesser von Endothelzellplasma, perikapillären Gliafortsätzen wie auch der Mitochondrien dieser beiden Zelltypen für eine frühzeitige transhemisphärische Ausbreitung der lösonsbedingten Funktionsstörung vom linken auf den rechten Cortex hin. Gleichzeitig nimmt das Hämostasepotential im intrakraniellen Gefäßkompartiment ab; extrakraniell fällt noch kein Gerinnungsdefekt auf.

Die Korrelationsanalyse dieser ersten Ödemphase ergibt im 10 min.-Intervall signifikante Korrelationen ausschließlich zwischen den Kerngrößenänderungen von Endothel-, Glia- und Nervenzellen des linksseitigen Cortex-Areals. Wie aus dem Graphen (ZIMMERMANN, u.a., 1974; Abb. 16) hervorgeht, zeichnen sich die am stärksten der Kältewirkung ausgesetzten Zellelemente, - d.h. Glia marginalis superficialis und Endothelzellen der Rindenschicht I., durch hohe Verknüpfungsgrade ($g = 3$) aus. Anschließend greift die Schrankenstörung an der Liquor-Hirn-Grenze sowie im Kapillarbereich der Rindenschicht I. auf die Endothel- und Gliazellen der angrenzenden Rindenschicht II. über; letztere sind durch je zwei signifikante Korrelationen mit den Kerngrößenänderungen der Glia marginalis superficialis bzw. der Endothelzellen in der Rindenschicht I. verbunden. Demgegenüber lassen sich 30 min. nach Versuchsbeginn hohe Korrelationen auch zwischen den Kerngrößenänderungen von Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexen in der korrespondierenden Schicht des lädierten Areals errechnen.

Die zweite Phase des kälteinduzierten Hirnödems beginnt 60 min. nach

Versuchsbeginn im intra- und extrakraniellen Gefäßstromgebiet mit einer Steigerung der Gerinnungsbereitschaft, die nach 12 Stunden in eine Hypokoagulabilität übergeht. In diesem Stadium geraten die Zellelemente der rechten Hemisphäre zunehmend stärker unter den Einfluß, der von dem Ödemzustand (bzw. der Nekrose) in der linken Hemisphäre ausgeht. Die signifikanten Korrelationen zwischen Kerngrößenänderungen von Endothel-, Glia-, Nervenzellen und der erythrozytengefüllten Kapillarstrecke in rechts- sowie linksgelegenen Cortexschichten nehmen zu: Korrelationen entwickeln sich a) zwischen der Abnahme der Kapillarlänge in der rechtsseitigen Schicht II. und den Kerngrößenänderungen in Nervenzell-Glia-Komplexen der entsprechenden kontralateralen Schicht, b) zwischen der Kernverkleinerung der rechtsseitigen Glia marginalis superficialis und der Endothelzellschwellung in der linksseitigen Cortex-Schicht I., sowie c) zwischen der Kernvergrößerung der Gliazellen in der rechtsseitigen Schicht II. und den Neuronen des entsprechenden linksseitigen Areals. Die Kernvergrößerung der Ganglienzellen in der rechtsseitigen Schicht I. verläuft parallel zur Kernschwellung der Endothelzellen in der linksseitigen Schicht I.

Die Dynamik der Ödementwicklung in der Läsionszone und ihre Auswirkung auf die Funktion von Zellverbänden der kontralateralen Hemisphäre läßt sich aus den cytometrischen Daten ableiten, die in aufeinanderfolgenden Zeitintervallen erhoben wurden. Danach reagieren zunächst die Zellelemente, die am Aufbau von Grenzstrukturen beteiligt sind: a) Glia marginalis superficialis im Bereich der Liquor-Hirn-Grenze und b) Endothelzell-Glia-Verbände, die die sog. "Blut-Hirn-Schranke" in den Rindenschichten I. und II. bilden. Das Übergreifen der Funktionsstörung von der Läsionszone auf die kontralateralen Cortexabschnitte verläuft über das Gefäßsystem, da 30 min. und 60 min. nach Versuchsbeginn die Änderungen des rechtsgelegenen

Kapillarkompartiments durch die meisten Korrelationen mit den ödembedingten linksseitigen Kompartimentgrößenverschiebungen verbunden sind. Die Kerngrößenänderungen von Endothel-, Glia- und Nervenzellen der Läsionszone, die auf Membranstörungen beruhen, erreichen im gleichen Zeitraum höhere Maximalwerte als die auf einer Funktionsalteration basierende Kernschwellung oder -schrumpfung dieser Zelltypen im korrespondierenden rechten Cortexareal.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Nervenzellen, die einen überdurchschnittlichen Sauerstoff- und Metaboliten-Umsatz haben, sind bei ihren geringen eigenen Energiereserven auf die Bildung von Leistungsgemeinschaften mit anderen Zellelementen (Glia- und Kapillarendothel) angewiesen. Das Energiedefizit der Neurone wird durch Metabolitenzufuhr über Endothel- und Gliazellen ausgeglichen; dieser Prozess ist dem neuronalen Stoffwechsel angepaßt. Bei erhöhtem Bedarf nimmt nicht nur die pro Kapillare geförderte Blutmenge, sondern auch die Dichte des durchströmten Kapillarnetzes zu; letzteres führt zur Verkürzung der Diffusionsstrecken zwischen Kapillaren und Nervenzell-Glia-Komplexen (LENIGER-FOLLERT, 1973). Gemessen wurden lokale aktivitätsbedingte Durchblutungszunahmen bis zu 120 % des Normwertes (LASSEN, 1973). Gleichzeitig kommt es in Glia- und Gonglienzellen zur Aktivierung der Enzymsysteme, die den Energiestoffwechsel kontrollieren. Diese Aktivitätszunahme hängt bei langdauernder Stimulation der Neurone von der RNS-gesteuerten Enzymneusynthese ab (HYDÉN, 1967).

Untersuchungen über den Zeitverlauf und das Ausmaß dieser Anpassungsvorgänge liefern Hinweise über die Entwicklung und Effektivität von Wechselbeziehungen zwischen Endothel-, Glia- und Nervenzellen. Die Analyse funktioneller Abhängigkeiten innerhalb von Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexen wurde früher durch die starke nur elektronenmikroskopisch sichtbare Verzahnung ihrer Zellfortsätze behindert. Eine genaue strukturelle Zuordnung der biochemisch-physiologischen Daten, insbesondere der Meßwerte an Gliazellpräparaten war schwierig (vgl. GIACOBINI, 1968). Man mußte daher nach quantitativen Methoden suchen, die indirekt Auskunft über metabolische Wechselbeziehungen zwischen Endothel-,

Glia- und Nervenzellen geben, ohne daß der Gewebsverband durch die präparativen Schritte und den Meßvorgang zerstört wird. Die cytometrische Bestimmung der aktivitätsabhängigen Größenänderung von Endothel-, Glia- und Nervenzell-Kompartimenten sowie von stoffwechselaktiven Zellorganellen (Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum) am Schnittpräparat hat den Vorteil, daß die topographischen Beziehungen der drei Zelltypen im Komplex gewahrt bleiben. Andererseits ist eine Zuordnung der Größenänderungen der Kompartimente zu einzelnen Stoffwechselparametern (z.B. O_2 -Verbrauch, ATP-Syntheserate, intrazelluläre Elektrolyt- und Proteinkonzentration) nicht möglich. Trotzdem kann durch Messung komplexerer Parameter, die als Indikatoren mehrerer voneinander abhängiger Stoffwechselschritte gelten, eine vereinfachte cytologische Funktionsanalyse des untersuchten Systems durchgeführt werden, ohne daß ein schwerwiegender Verlust von Information eintritt. So besteht eine Proportionalität zwischen RNS- bzw. Proteingehalt und Zell- sowie Kerngröße (Übersicht bei PALKOVITS und FISCHER, 1968). Die Kapillardichte steht in einer engen Beziehung zum Mitochondriengehalt des benachbarten Gewebsbezirks (E.SCHARRER, 1945). Mitochondriengröße und Packungsdichte der Cristae gelten als Relativmaß der zellulären Atmungsaktivität (PYSH und KAHN, 1972). Funktionsbedingte Änderungen dieser Relationen basieren 1) auf der freien Permeabilität der Zellmembranen im Nervensystem für Wasser. Elektrolyte kontrollieren über ihre osmotische Aktivität den Gehalt von "freiem, austauschbarem Wasser" im Hirngewebe (KIYOTA, 1959). Somit steuern die neuronalen Depolarisations-, Repolarisationsvorgänge über Elektrolytverschiebungen die intrazelluläre Hydratation. Außerdem spielen die extrazellulären Konzentrationen kleinmolekularer Metabolite (Glucose, Aminosäuren) eine Rolle bei der Änderung der Hydrationsverhältnisse (FLORKIN und

SCHOFFENIELS, 1965). Die hieraus ableitbaren Größenänderungen von Zellkompartimenten sind Relativwerte zur Beurteilung a) der zellulären Stoffwechselaktivität (vor allem der Neurone) und b) der Kapazität von Zellelementen, die für den Metabolitentransport zuständig sind (Glia- und Endothelzellen).

2) Größenvariationen von Zellkompartimenten können auch auf einer echten aktivitätsabhängigen Substanzvermehrung bzw. -abnahme beruhen, die sich meist in Form einer Änderung der Protein- und/oder RNS-Konzentration manifestiert.

Die Berücksichtigung dieser Abhängigkeiten bei der Interpretation der eigenen cytometrischen Daten aus Untersuchungen über die Entwicklung von Wechselbeziehungen zwischen Kapillarkompartiment und Nervenzell-Glia-Komplexen unter physiologischen bzw. pathologischen Bedingungen führt zu folgenden Ergebnissen: Die Dichte des Kapillarnetzes ist unter "Normbedingungen", d.h. bei relativer Funktionsruhe (Kontrolltiergruppen), den Bedürfnissen eines bestimmten Ganglienzelltyps im angrenzenden Gewebsbezirk angepaßt. Im Bereich nichtsekretorischer Neurone (Vorderhorn des Lumbalmarks der Ratte, Schicht II. des Parietalcortex von Kaninchen) schwankt die Kapillarlänge zwischen 400 mm/mm^3 (Lumbalmark) und 600 mm/mm^3 (Parietalcortex). Übernehmen Kapillaren nicht nur Funktionen im Rahmen des Sauerstoff- und Metabolitentransports sondern auch für die Neurosekretion, so ist die Kontaktfläche zwischen Kapillaren und Neuronen größer. Im Areal I. des Oberschlundganglions von Lumbricus terrestris, dem Gebiet der "Gomori-positiven" Neurone, die nach neuerer Definition zu den peptidergen sekretorischen Nervenzellen gehören, mißt man Kapillarlängen um 3000 mm/mm^3 . Trotz der unterschiedlichen Kapillar-Nervenzell-Relationen reagiert das

Kapillarsystem in allen drei untersuchten Hirngebieten auf maximale Stimulation der Neurone mit einer Änderung der durchbluteten Kapillarlänge um etwa 100 %. Auch LASSEN (1973) errechnete aus seinen Clearance-Bestimmungen aktivitätsabhängige Änderungen der lokalen Hirndurchblutung in dieser Größenordnung. Von der Dichtezunahme des Kapillarbett profitieren vor allem kleine Neurone, die normalerweise keine so engen Kapillarbeziehungen aufweisen wie große Neurone (Kernfläche $> 150 \mu\text{m}^2$); letztere liegen meist asymmetrisch in den Maschen des Kapillarnetzes, so daß ein Teil ihres Plasmalemm nur wenige μm vom nächsten Kapillarquerschnitt entfernt ist. Stoffwechselaktive Zellorganellen (Mitochondrien, Zisternen des ER) häufen sich im Gebiet der Kontaktstellen zwischen kapillären Endothelzellen, Glia- und Nervenzellen; dadurch verringern sich die Austauschstrecken zwischen Kapillarlumen und gliösen sowie neuronalen Mitochondrien bzw. Zisternen des ER. Unter pathologischen Bedingungen (kälteinduziertes Hirnödem) sind a) die Zunahme dieser Austauschstrecke und b) die Schwellung der Mitochondrien die empfindlichsten cytometrischen Indikatoren, um Störungen der Transportprozesse im Bereich der "Blut-Hirn-Schranke" nachzuweisen.

Um die oben aufgezeigten Interpretationsschwierigkeiten der cytometrischen Befunde zu überwinden, wurden die in aufeinanderfolgenden Zeitintervallen gemessenen Unterschiede der Parameterwerte standardisiert, d.h. in Relation zum entsprechenden Kontrollwert gesetzt. Aus den gepaarten, standardisierten Meßwertänderungen wurden Korrelationskoeffizienten errechnet und in Form von ungerichteten Graphen dargestellt. Hierdurch war es möglich, die Auswirkung einer Änderung des Parameterwerts auf das Gesamtsystem zu beurteilen. Unter physiologischen Bedingungen bestimmt die Aktivität der Neurone die Entwicklung von Wechselbeziehungen innerhalb der Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexe. Die Stimulation führt zur allmählichen Synchron-

nisation des Entladungsmusters einer Neuronenpopulation, auf die eine gleichgerichtete Reaktion des perineuronalen Kapillarstromgebiets folgt. Die Adaptionprozesse benötigen Zeit, daher verläuft die cytometrisch bestimmbare Zellreaktion phasenhaft. So korreliert die Mehrdurchblutung der lumbalen Vorderhornregion nach 3stündiger Stimulation der Nn. gastrocnemii mit der Aktivitätszunahme der antidrom gereizten α -Motoneurone, in der zweiten Phase (5 - 7stündige Stimulation) mit der der transsynaptisch erregten Interneurone. In Gebieten mit sekretorischen Neuronen nimmt die durchblutete Kapillarestrecke während der Entleerung der Neurosekretdepots ab und vergrößert sich im darauffolgenden Zeitintervall, in dem die Sekretneusynthese überwiegt.

Eine zentrale Rolle spielt hingegen das Gefäßsystem bei der Ausbreitung der corticalen Funktionsstörung, die im Verlauf eines kälteinduzierten Hirnödems von der Läsionszone auf das korrespondierende Cortexareal der anderen Hemisphäre übergreift. In den entsprechenden Zeitintervallen, 30 min. und 60 min. nach Kälteläsion des linken Parietalcortex, sind die Änderungen des rechtsgelegenen Kapillarkompartiments durch die meisten Korrelationen mit den ödembedingten Kompartimentänderungen in der Läsionszone verbunden.

Die vorgelegten Korrelationsstudien an cytometrisch bestimmten Änderungen der Kompartimentanteile von komplexbildenden Endothel-, Glia- und Nervenzellen im adäquaten Stimulationsversuch führten zum Nachweis von Wechselbeziehungen zwischen diesen drei Zelltypen. Neben der Kompartimentgröße wurden hier auch mikrospektrographische Messungen der intraneuronalen Protein- und Nucleinsäurekonzentration zur Beurteilung der Zellaktivität herangezogen.

Die Suche nach weiteren biochemischen Parametern, die sich am intakten Gewebsverband bestimmen lassen, muß fortgesetzt werden; es wird besonders an die Anwendung von quantitativen enzymhisto-

chemischen Methoden gedacht. Zur Klärung der komplexen Wechselbeziehungen innerhalb von Endothel-Glia-Nervenzell-Verbänden dürfte die Verfeinerung der graphentheoretischen Analyse nach Berücksichtigung einer noch größeren Anzahl von physiologischen, biochemischen und cytometrischen Parametern beitragen. Der Schwerpunkt dieser zukünftigen eigenen Forschungsarbeit wird auf dem Gebiet von neuropathologischen Prozessen (z.B. Hirninfarkt, neuromuskuläre Erkrankungen) liegen.

5. Literatur

- ABOOD, L.G., GEIGER, A.: Breakdown of proteins and lipoids during glucose-free perfusion of the cat's brain. Amer. J. Physiol. 182, 557 (1955).
- AMANO, M., LEBLOND, C.P., NADLER, N.J.: Radioautographic analysis of nuclear RNA in mouse cells revealing three pools with different turnover times. Exp. Cell Res. 38, 314 - 340 (1965).
- AROS, B., BODNAR, E.: Histologische Untersuchungen über die neurohumorale Funktion von Eisenia rosea (Oligochaeta). Symp. Biol. Hung. 1, 191 - 202 (1960).
- BENNINGHOFF, A.: Funktionelle Kernschwellung und Kernschrumpfung Anat. Nachr. 1, 50 - 52 (1950).
- BEST, C.H., TAYLOR, N.B.: The physiological basis of medical practice. Eighth edition. pp. 1 - 24. Baltimore: Williams & Wilkins 1966.
- BÜCHER, TH., KLINGENBERG, M.: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. Angew. Chem. 70, 552 (1958).
- CAJAL, S.R.Y.: Degeneration and regeneration in the nervous system. Transl. from Spanish ed. of 1913. London: Oxford Univ. Press 1928.
- CASPERSSON, T.O.: Cell growth and cell function. New York: Norton 1950.
- CITOLER, P., CITOLER, K., HEMPEL, K., SCHULTZE, B., MAURER, W.: Autoradiographische Untersuchungen mit zwölf H^3 und fünf C^{14} markierten Aminosäuren zur Größe des nucleären und cytoplasmatischen Eiweißstoffwechsels bei verschiedenen Zellarten von Maus und Ratte. Z. Zellforsch. 70, 419 - 448 (1966).
- COBB, S., TALBOTT, J.H.: Studies on the cerebral circulation. III. A quantitative study of cerebral capillaries. Trans. Ass. Amer. Physicians 42, 255 (1927).
- COULTER, J.N.A.: Filtrationcoefficient of the capillaries of the brain. Am. J. Physiol. 195, 459 - 464 (1958).

- CRAIGIE, E.H.: Measurements of vascularity in some hypothalamic nuclei of the albino rat. In: *The hypothalamus and central levels of autonomic function*, Proc. Ass. Dec. 20 - 21, 1939, New York, pp. 310 - 319 Baltimore: Williams a. Wilkins 1940.
- DIEMER, K.: Über die Sauerstoffdiffusion im Gehirn. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 285, 99 - 109 (1965).
- DRISCHEL, H.: *Regelvorgänge in der Biologie*. München: Oldenbourg 1956.
- EICHNER, D.: Über funktionelle Kernschwellung in den Nuclei supra-optici und paraventriculares des Hundes bei experimentellen Durst-zuständen. *Z. Zellforsch.* 37, 406 - 414 (1952).
- ERBSLÖH, F.: Über die Glucosebilanz von Leber und Gehirn und ihre Belastungs- und Schadensstufe. *Habil.-Schrift. Düsseldorf-München* 1953.
- FISCHMEISTER, H.F.: Apparative Hilfsmittel in der Stereologie. In: WEIBEL, E.R., ELIAS, H.: *Quantitative Methods in Morphology*, pp. 221 - 249. Berlin: Springer 1967.
- FLORKIN, M., SCHOFFENIELS, E.: Euryhalinity and the concept of physiological radiation. In: *Studies in comparative biochemistry*; pp. 6 - 40 (Ed.: K.A. MUNDAY), 23, Oxford - London - Edinburgh - New York - Paris - Frankfurt: Pergamon Press 1965.
- FORBES, H.S., COBB, S.S.: Vasomotor control of cerebral vessels. *Brain*, 61, 221 (1938).
- GÄNSHIRT, H.: *Der Hirnkreislauf. Physiologie, Pathologie, Klinik*. Stuttgart: Thieme 1972.
- GEIGER, A.: Correlation of brain metabolism and function by the use of a brain perfusion method in situ. *Physiol. Rev.* 38, 1 - 20 (1958).
- GIACOBINI, E.: Chemical studies on individual neurons. pp. 1 - 71. In: *Neurosciences Research*, Vol. 1 (Eds.: EHRENPREIS, S., SOLNITZKY, O.C.). New York-London: Academic Press 1968.
- GRUNEWALD, W.: Theoretical analysis of the oxygen supply in tissue. In: *Oxygen transport in blood and tissue*. pp. 100 - 123 (Eds.: LÜBBERS, D.W., LUFT, U.C., THEWS, G., WITZLEB, E.) Stuttgart: Thieme 1968.
- HAGER, H.: *Allgemeine morphologische Pathologie des Nervengewebes*. Berlin - Heidelberg - New York: Springer 1968.

- HAMBERGER, A.: Amino acid uptake in neuronal and glial cell fractions from rabbit cerebral cortex. *Brain Res.* 31, 169 - 178 (1971).
- HELDT, H.W.: Morphologische und funktionelle Kompartimentierung des Zellstoffwechsels pp. 225 - 269. In: Physiologie des Menschen. Vol. 1. Bioenergetik. (Eds.: BADER, H., HELDT, H.W., KARGER, W., LÜBBERS, D.W.) München - Berlin - Wien: Urban u. Schwarzenberg 1972.
- HENN, F.A., HALJAMÄE, H., HAMBERGER, A.: Glial cell function: Active control of extracellular K^+ concentration. *Brain Res.* 43, 437 - 443 (1972).
- HERLANT - MEEWIS, H.: Reproduction et neurosécrétion chez Eisenia foetida (Sav.) Ann. Soc. roy. Zool. Belg. 87, 151 - 186 (1956 - 57).
- HILL, D.K.: The volume change resulting from stimulation of a giant nerve fibre. *J. Physiol. (Lond.)* 111, 304 - 327 (1950).
- HORSTMANN, E., MEVES, H.: Die Feinstruktur des molekulären Ringengraues und ihre physiologische Bedeutung. *Z. Zellforsch.* 49, 569 - 604 (1959).
- HYDEN, H.: The neuron. Amsterdam: Elsevier 1967.
- ILLIG, L.: Die terminale Strombahn. Berlin - Göttingen - Heidelberg: Springer 1961.
- KAMEMOTO, F.J.: The influence of the brain on osmotic and ionic regulation in earthworms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 4, 420 - 426 (1964).
- KIYOTA, K.: Electrophoretic protein fractions and the hydrophilic property of brain tissue. II. The proteins of brains with edema. *J. Neurochem.* 4, 209 - 216 (1959).
- KORMAN, F., ADDINK, A.D.F., WAKABAYASHI, T., GREEN, D.E.: A unified model of mitochondrial morphology. *Bioenergetics* 1, 9 - 32 (1970).
- KROGH, A.: The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J. Physiol. (Lond.)* 52, 409 - 415 (1919).

- KUFFLER, S.W., NICHOLLS, J.G.: The physiology of neuroglial cells. *Erg. Physiol.* 57, 1 - 90 (1966).
- LASSEN, N.A., INGVAR, D.H.: Die regionale Durchblutung des Gehirns und ihre Störungen. *Verh. deutsch. Ges. Kreislaufforsch.* 39, (1973) im Druck.
- LAUE, R.: Elemente der Graphentheorie und ihre Anwendung in den biologischen Wissenschaften. Leipzig: Geest u. Portig 1970.
- LENIGER - FOLLERT, E.: Mikrozirkulation und Sauerstofftransport im Gehirn. *Verh. deutsch. Ges. Kreislaufforsch.* 39, (1973) im Druck.
- LÜBBERS, D.W.: The oxygen pressure field of the brain and its significance for the normal and critical oxygen supply of the brain. In: *Oxygen transport in the blood and tissue*. (Eds.: LÜBBERS, D. W., LUFT, U.C., THEWS, G., WITZLEB, E.) pp. 124 - 139. Stuttgart: Thieme 1968.
- MYHRBERG, H.E.: Monoaminergic mechanisms in the nervous system of *Lumbricus terrestris* L. *Z. Zellforsch.* 81, 311 - 343 (1967).
- NOACK, C.: Zum Problem der Aussagekraft von biophysikalischen Modellen auf dem Gebiet der pflanzlichen Transpiration unter besonderer Berücksichtigung der meteorologischen Umweltbedingungen. Dissertation, Leipzig 1968.
- OKSCHE, A., ZIMMERMANN, P., OEHMKE, H.-J.: Morphometric studies of tubero - eminential systems controlling reproductive functions. *Brain - Endocrine Interaction*. 1971, pp. 142 - 153. Basel: Karger 1972.
- OPITZ, E., SCHNEIDER, M.: Über die Sauerstoffversorgung des Gehirns und den Mechanismus der Mangelwirkung. *Ergebn. Physiol.* 46, 126 - 260 (1950).
- OTREMBIA, P.: Beobachtungen an neurosekretorischen Zellen des Regenwurms (*Lumbricus spec.*). *Z. Zellforsch.* 54, 421 - 436 (1961).
- PALETTA, B.: Zum Stabilitätsverhalten biologischer Systeme. *Z. Biol.* 116, 309 - 410 (1970).

- PALKOVITS, M., FISCHER, J.: Karyometric investigations. Budapest: Academia Kiadó 1968.
- PUFF, A.: Funktionelle Kernschwellung an Sinneszellen. Med. Diss. Marburg 1950.
- PYSH, J.J., KAHN, T.: Variations in mitochondrial structure and content of neurons and neuroglia in rat brain: An electron microscopic study. Brain Res. 36, 1 - 18 (1972).
- QUASTEL, J.H.: Carbohydrate metabolism in the nervous system. In: The structure and function of nervous tissue pp. 62 - 107 Vol. III. (Ed.: BOURNE, G.H.) New York - London: Academic Press 1969.
- RASHEVSKY, N.: Topology and life. In: Search of general mathematical principles in biology and sociology. Bull. Math. Biophysics. 16, 317 (1954).
- ROSE, S.P.R. und SINHA, A.K.: Some properties of isolated neuronal cell fractions. J. Neurochem. 16, 1319 - 1328 (1969).
- ROSEN, R.: The representation of biological system from the stand-point of the theory of categories. Bull. Math. Biophysics. 20, 317 (1958).
- RUDE, S.: Monoamine - containing neurons in the nerve cord and body wall of Lumbricus terrestris. J. comp. Neurol. 128, 397 - 412 (1966).
- RUSKA, H.: Über funktionelle Konsequenzen der Vielphasigkeit der Zelle. In: IV. Internat. Congr. Neuropath. München 1961. Vol. II, pp. 42 - 49 Stuttgart: Thieme 1962.
- SACHS, H., PORTANOVA, R., HALLER, E.W., SHARE, L.: Cellular processes concerned with vasopressin biosynthesis, storage and release. In: Neurosecretion. IV. Int. Symp. Neurosecr. Sherbourg, 25. - 27. Jul. 1966, pp. 146 - 164 (Ed.: F. STUTINSKY) Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.
- SCHARRER, E.: Gefäß und Nervenzelle. Z. Neurol. 158, 93 - 99 (1937).
- SCHARRER, E.: Capillaries and mitochondria in neuropil. J. comp. Neurol. 83, 237 - 243 (1945).

- SJÖSTRAND, F.S., BARAJAS, L.: A new model for mitochondrial membranes based on structural and biochemical information. J. Ultrastruct. Res. 32, 293 - 306 (1970).
- SMITH, C.S., GUTTMAN, L.: Measurement of internal boundaries in threedimensional structures by random sectioning. Trans. Am. Inst. Mining Met. Engrs. 197, 81 (1953).
- SOKOLOFF, L.: The action of drugs on the cerebral circulation. Pharmaceut. Rev. 11, 1 (1959).
- STRUCK, G., UMBACH, W.: Das elektronenmikroskopische Bild in Rinde und Mark beim gleichen Patienten vor und nach Dehydrierung. Neurochir. 7, 64 - 77 (1964).
- TAKEUCHI, N.: Neurosekretory element in the central nervous system of the earthworm. Sci. Rep. Tohoku Univ., Ser. IV (Biol.) 31, 105 - 116 (1965).
- TAKEUCHI, N.: Structure of interganglionic neuropil of the cerebral ganglion of the earthworm with special reference to the neurosecretion. Sci. Rep. Tohoku Univ., Ser. IV. (Biol.) 34, 13 - 20 (1968).
- TEICHMANN, I., AROS, B.: Fluorescence microscopic demonstration of catecholamine containing nerve cells and fibres in the central nervous system of invertebrates. Acta morph. Acad. Sci. hung. 14, 350 (1966).
- TORACK, R.M., DUFFY, M.L., HAYNES, J.M.: The effect of anisotonic media upon cellular ultrastructure in fresh and fixed rat brain. Z. Zellforsch. 66, 690 - 700 (1965).
- WEIBEL, E.R., ELIAS, H.: Quantitative methods in morphology. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.
- WOLFF, H.G., LENNOX, W.G., ALLEN, M.B.: Cerebral circulation. XII. The effect on pia vessels of variations in the oxygen and carbon dioxyd content of the blood. Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) 23, 1097 (1930).
- ZIMMERMANN, P.: Methodische Modifikationen und eine neue Technik zur Darstellung des neurosekretorischen Apparates und der Neuroglia bei Wirbellösen (Lumbricus terrestris L.). Z. wiss. Mikr. 68, 154 - 162 (1967).
- ZIMMERMANN, P.: Beziehungen verschiedenartiger Zellkomplexe des normalen und regenerierenden Nervensystems von Lumbricus terrestris L. zum Gefäßsystem. Z. Zellforsch. 106, 423 - 438 (1970 a).

- ZIMMERMANN, P.: Die intracytoplasmatische Organellenverteilung als Indikator gerichteter Wechselbeziehungen zwischen Kapillarsystem und zentralnervösen Zellkomplexen. Morphometrische Studien am Oberschlundganglion von Lumbricus terrestris L. Z. Zellforsch. 110, 268 - 283 (1970 b).
- ZIMMERMANN, P.: Die zentralnervöse Kontrolle der Dehydratation bei Lumbricus terrestris L. Z. Zellforsch. 112, 551 - 571 (1971).
- ZWET NOW, N: CBF autoregulation in blood pressure and intracranial pressure variations. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 102, V.: A (1968).

Abb. 1. Albinoratte. Entfernung (ϵ) der Nucleolen vom Kernzentrum (μm) von 100 Motoneuronen aus den Segmenten L_6-S_1 : Ohs Kontrolltier. Auch nach 3stündiger (3hs) und 7stündiger (7hs) Stimulation bleibt die Verteilung der Nucleolen nahezu konstant.

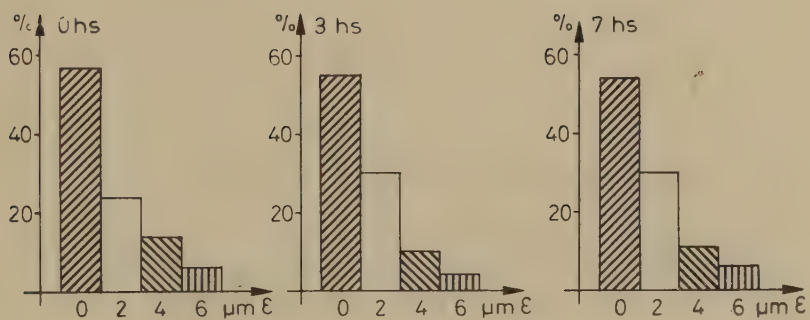


Abb. 2. Albinoratte (Rückenmark). Änderung der Mittelwerte (o) und Streuung (●) in je 10 aufeinanderfolgenden Messungen (n).

a) P_A Trefferzahl für Kapillarlängenbestimmung. b) P_{AN} Trefferzahl für Kernflächenbestimmung von Motoneuronen aus den Segmenten L_6-S_1 .

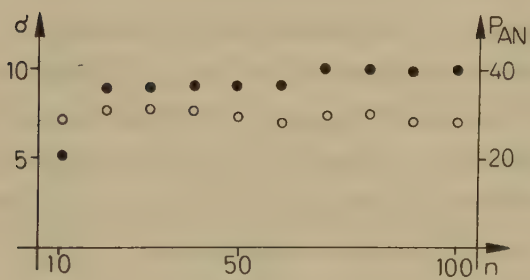
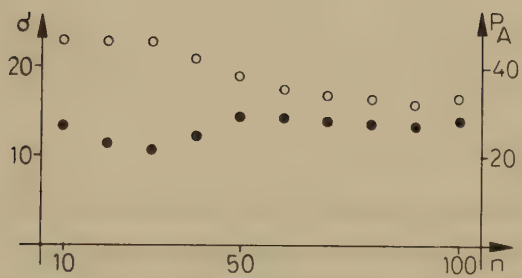
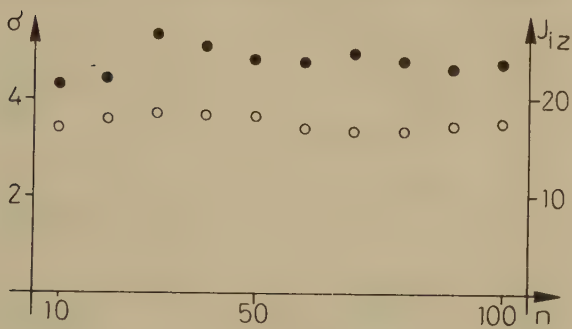
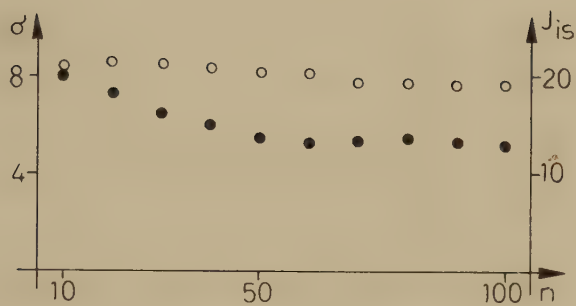
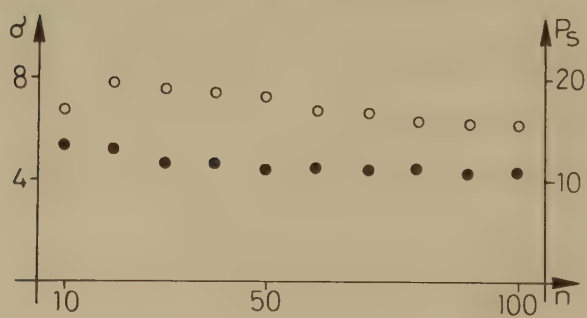
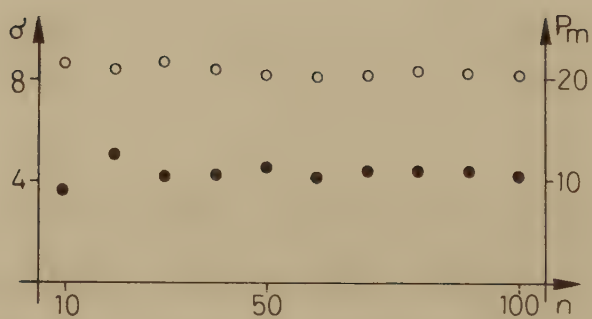
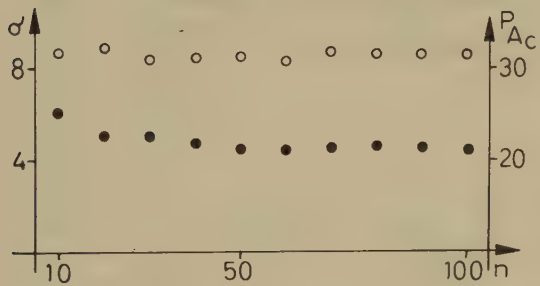
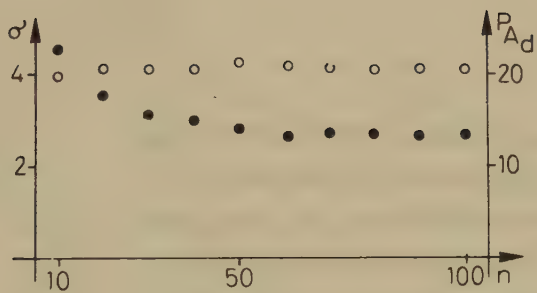


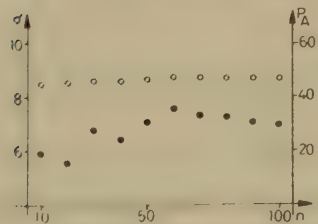
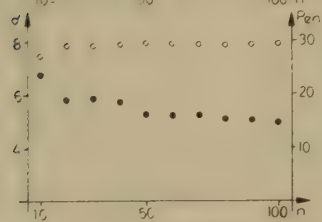
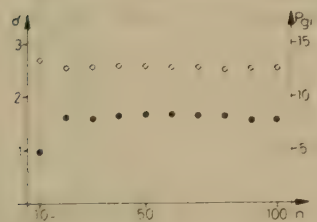
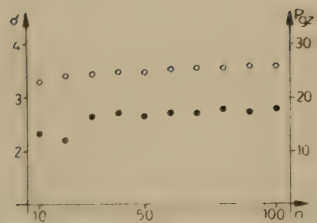
Abb. 3. Lumbricus terrestris. Änderung der Mittelwerte ($\circ$) und Streuung ($\bullet$) in je 10 aufeinanderfolgenden Messungen (n). a) I_{is} Schnittpunktzahl zur Umfangbestimmung des Stäbchenkanals. b) I_{iz} Schnittpunktzahl zur Umfangbestimmung des Zilienkanals. c) P_m Trefferzahl zur Bestimmung der Volumendichte der schleimproduzierenden Epidermiszellen. d) P_s Trefferzahl zur Bestimmung der Volumendichte der Stützzellen. e) P_{Ad} Trefferzahl zur Kernflächenbestimmung der Darmepithelzellen. f) P_{Ac} Trefferzahl zur Kernflächenbestimmung der Chloragogenzellen.







- Abb. 4. Parietalcortex von Kaninchen. Änderung der Mittelwerte (o) und Streuung (●) in je 10 aufeinanderfolgenden Messungen (n).
- a) P_{gz} Trefferzahl zur Kernflächenbestimmung von Ganglienzellen.
 - b) P_{gi} Trefferzahl zur Kernflächenbestimmung von Gliazellen.
 - c) P_{en} Trefferzahl zur Kernflächenbestimmung von Endothelzellen.
 - d) P_A Trefferzahl zur Kapillarlängenbestimmung.



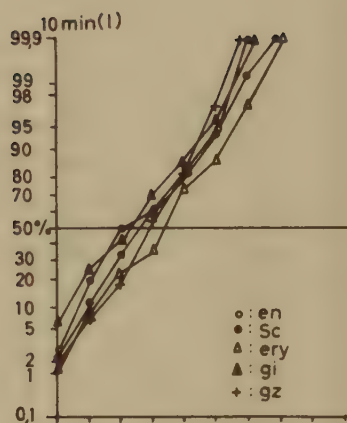
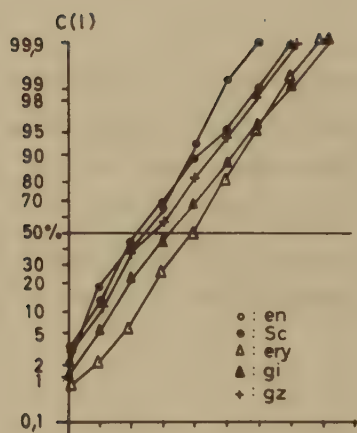


Abb.5. Darstellung der Meßwertverteilung im Wahrscheinlichkeitsnetz. Die Meßparameter bleiben auch im Verlauf des Experiments normalverteilt. en Kernfläche von Endothelzellen. gi Kernfläche von Gliazellen. gz Kernfläche von Ganglienzellen.

Abb. 6. Strukturgraph, der die wichtigsten Stoffwechselprozesse eines endokrinen, zugleich sekretorischen Neurons nach Stimulation darstellt. Der Reiz (R) führt zur Membrandepolarisation (MD_p). Das aktivierte Neuron kann mit 5 verschiedenen Reaktionen auf die Stimulation antworten: 1) Auf die Membrandepolarisation folgt eine intrazelluläre Natrium-erhöhung, so daß die intrazelluläre osmotische Aktivität (π_z) steigt; passiv folgt ein vermehrter Wassereinstrom (H_e), der eine Volumen-zunahme (V_z) bedingt (-.-.-). 2) Nach der Membrandepolarisation wird das Ruhepotential wieder aufgebaut (W_{Rp}). Der ATP-verbrauchende Prozeß (ATP_v) führt einerseits zur Eliminierung von intrazellulärem, überschüssigem Natrium und damit zur Herabsetzung der intrazellulären osmotischen Aktivität, andererseits bedeutet der Zerfall von ATP in ADP und Phosphationen eine Zunahme der intrazellulären osmotischen Aktivität (----). 3) Auf die Membrandepolarisation antwortet das Neuron mit Transmitterfreisetzung (T_f), und die intrazelluläre osmotische Aktivität (π_a) fällt. Um isomolare Verhältnisse zu erreichen, diffundiert Wasser aus der Zelle heraus (H_o), und das Zellvolumen nimmt ab (V_a) (.....). 4) Auf die Membrandepolarisation folgt Hormonsekretion (H_s) d.h. das Neuron verliert hochmolekulare Bausteine; dieser Substanzverlust wirkt sich direkt als Volumenabnahme aus (-----). 5) Langzeitstimulation führt zur Aktivierung der RNS-Synthese und zur RLS-gesteuerten Neusynthese von Proteinen (P_s), Hormonen (H_p) und Transmittern (T_s). Während durch Produktion von RNS, Proteinen und Hormonen intrazelluläre Substanzvermehrung und Volumenzunahme resultieren, geht die Transmittersynthese mit Zunahme der intrazellulären osmotischen Aktivität einher, da Aminosäuren (AS) mobilisiert und transformiert werden müssen. Diese Prozesse sind energieabhängig und benötigen Glucose (Gluc) sowie ATP. Die letztgenannten Stoffwechselschritte ergeben höhere intrazelluläre osmotische Aktivitäten, d.h. über vermehrten intrazellulären Wassereinstrom steigt das Zellvolumen.

AS_{Tr} Aminosäuretransport, ATP_s ATP-Synthese, $Gluc_{Tr}$ Glucose-transport, M_{ATP} Metaboliten der ATP-Synthese, M_{RNS} Metaboliten der RNS-Synthese. Zahlenverhältnisse in Klammern bedeuten: Erste Zahl-Eingangsrelation, d.h. Pfeile zeigen auf Punkt. Zweite Zahl-Ausgangsrelationen, d.h. Pfeile weisen von Punkt weg.

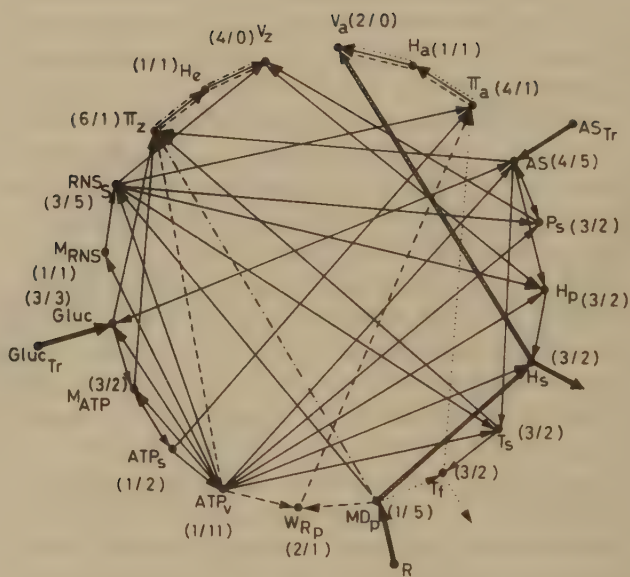


Abb. 7. Kälteinduziertes Hirnödem im linken Parietalcortex von Kaninchen. Reaktionen der Neurone in der links (l) - bzw. rechtsseitigen (r) Rindenschicht II. Kältebedingte Störung des Membrantransports führt zur massiven Kernvergrößerung in Neuronen der linksseitigen Schicht II., während im korrespondierenden Areal der Gegenseite nur 10 - 15 %ige Kernflächenzunahmen meßbar sind.

$\Delta\%$ A_{Ngzr}

40

20

30 60 120 min

$\Delta\%$ A_{Ngzl}

40

20

30 60 120 min

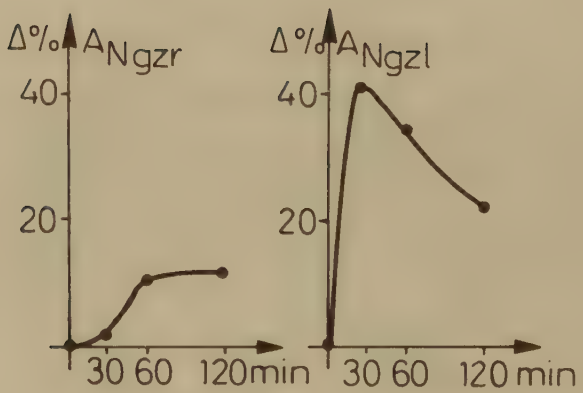
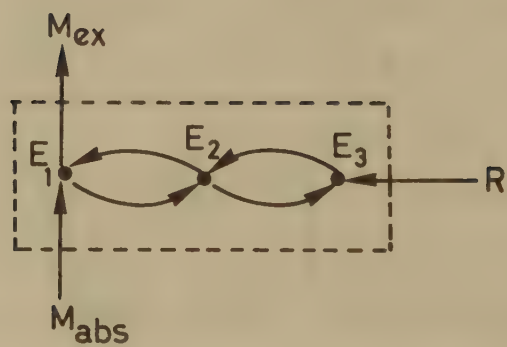


Abb. 8. Strukturgraphen von Endothel-Glia-Nervenzell-Komplexen.

a) Allgemeinste Form. Das aktive Element des Systems ist die Nervenzelle (E_3), die die Reize (R) umsetzt. Die Aktivierung des Neurons wirkt sich über zwei Zyklen auf Glia- und Endothelzellen aus. Über die Gliazellen (E_2) verlaufen die Austauschvorgänge zwischen Neuronen und Kapillarsystem. Die Endothelzellen (E_1) stehen am anderen Ende der Reaktionskette und sorgen für Metabolitenabsorption (M_{abs}) bzw. -exkretion (M_{ex}).

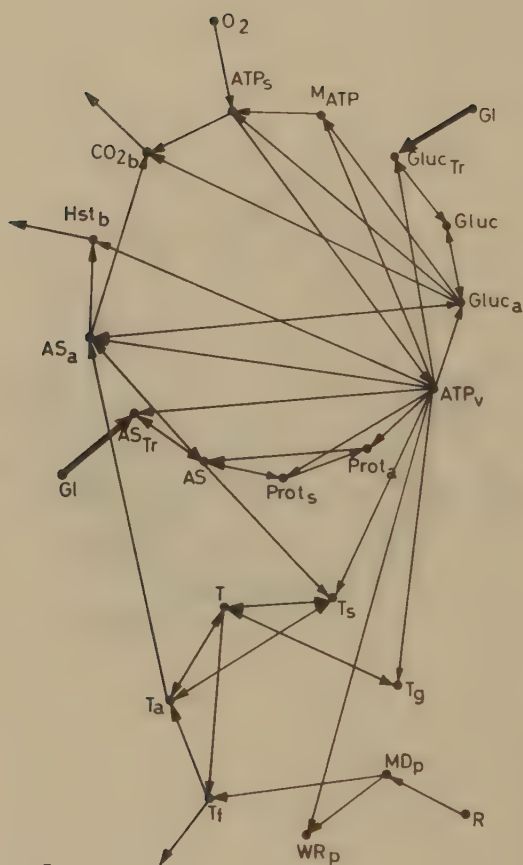
b) Strukturgraph, der den Metabolitenfluß durch Endothel- und Gliazellen beschreibt (Einzelheiten s.S. 19). AS_N - Aminosäuretransport zum Neuron, CO_{2b} - CO_2 -Produktion, $Gluc_a$ - Glucoseabbau, $Gluc_N$ - Glucosetransport zum Neuron, Hst_b - Harnstoffbildung, O_2 - Sauerstoffverbrauch, $Prot_a$ - Proteinabbau, $Prot_s$ - Proteinsynthese. c) Strukturgraph eines nichtsekretorischen Neurons (Einzelheiten s.S. 19). T - intrazellulärer, nicht granulär gebundener Transmitter, T_a - Transmitterabbau, T_g - granuläre Speicherung von Transmitter, Erklärung der übrigen Symbole s. Abb. 6.



a



b

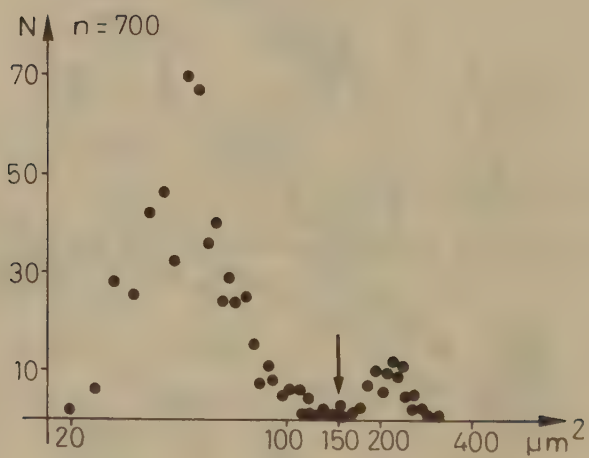


c

Abb. 9. Graphische Rekonstruktion von Querschnittserien aus dem Lumbalmark der Ratte. Neuron-Kapillarbeziehungen, medial, dors dorsal. Einzelheiten s.S. 20.



Abb. 10. Albinoratte. Kerngrößenverteilung (Kernfläche, μm^2)
von 700 Neuronen aus den Segmenten $L_6 - S_1$. Der Grenzwert zwischen den beiden Häufigkeitsgipfeln liegt bei $150 \mu\text{m}^2$ ($\uparrow$).



7. Veröffentlichungen zum Thema

7.1. Änderungen des Aktivitätsmusters der Vorderhornneurone
der Albinoratte nach antidromer Langzeitreizung.

Änderungen des Aktivitätsmusters der Vorderhornneurone der Albinoratte nach antidromer Langzeitreizung

P. Zimmermann *

Zentrum für Anatomie und Cytobiologie, Justus Liebig-Universität, Giessen

H. Wolff und F.W. Klußmann

William Kerckhoff-Institut der Max-Planck-Gesellschaft, Bad Nauheim

Eingegangen am 25. Juni 1973

Changes in the Activity Pattern of Spinal Motoneurons and Interneurons of the Albino Rat after Long-lasting Antidromic Stimulation

Summary. Functional interrelationships between nerve cell complexes and blood vessels in the lumbar enlargement of the spinal cord can be established by measuring changes of nuclear area of neurons and length of blood-filled capillaries during long-lasting controlled antidromic stimulation of both left gastrocnemius nerves in albino rats (frequency: 1 Hz; duration: 0.1 msec; supramaximal strength to depolarize α -motoneurons). During the first three hours of stimulation antidromically activated motoneurons (nuclear area $> 150 \mu\text{m}^2$) respond by a decrease of their nuclear area (10–15%). At the same time a transsynaptic bombardment of small interneurons (nuclear area about $40 \mu\text{m}^2$) via collaterals of directly stimulated motor axons results in an increase of their nuclear area. Between the fifth and seventh hour of continuous stimulation the larger interneurons ($50\text{--}70 \mu\text{m}^2$) are activated in both left and right halves of segments $\text{L}_6\text{--S}_1$. Seven hours of continuous stimulation are needed to activate large neurons (nuclear area $> 150 \mu\text{m}^2$) situated contralaterally to the antidromically discharged left gastrocnemius motoneurons. Therefore, synchronous antidromic stimulation of left gastrocnemius motoneurons is followed by phasic activation of nearby interneurons of different nuclear size. The increase of neuronal activity is accompanied by a continuous opening of capillaries up to a total length of about 800 mm/mm^3 in the left ventral horn of segments $\text{L}_6\text{--S}_1$. Significant coefficients of correlation indicate that during the first three hours of stimulation the antidromic depolarization of gastrocnemius motoneurons results in increased spinal capillary circulation, but in the second period (5–7 hours) this process relates to trans-synaptically activated interneurons.

Key words: Spinal cord, rat — Motoneurons, interneurons — Antidromic stimulation — Activity pattern — Cytometry.

Zusammenfassung. Unter standardisierten Reizbedingungen lassen sich Wechselbeziehungen zwischen Nervenzellkomplexen und Hirndurchblutung aus dem Grad der neuronalen Kernvergrößerung und der gleichzeitig gemessenen Längenänderung der erythrocytengefüllten Kapillarstrecke in der Gewebseinheit ableiten. Innerhalb der ersten Phase (1.—3. Std) einer achtstündigen Dauerstimulation des linken medialen und lateralen N. gastrocnemius von Albinoratten (Frequenz: 1 Hz; Impulsdauer: 0,1 msec; Reizstärke: Supramaximal zur antidromen Stimulation von α -Motoneuronen) beobachtet man in den ipsilateralen Segmenten $\text{L}_6\text{--S}_1$ eine 10–15%ige Abnahme der Kernfläche antidrom gereizter Motoneurone (Kernfläche $> 150 \mu\text{m}^2$). Gleichzeitig erfolgt über Axonkollateralen der stimulierten Gastrocnemius-Motoneurone eine transsynaptische Aktivierung kleinkerniger Interneurone (Kernfläche: etwa $40 \mu\text{m}^2$). In der zweiten Phase (5.—7. Std) werden ipsi- und kontralaterale Interneurone

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft. (Arbeitskreis Prof. Dr. A. Oksche).

mit größerer Kernfläche ($50\text{--}70\ \mu\text{m}^2$) in die Reizausbreitung einbezogen. Erst nach siebenstündiger Reizung sprechen auch große Neurone (Kernfläche $> 150\ \mu\text{m}^2$) an, die kontralateral zu der direkt stimulierten Rückenmarkshälfte liegen. Somit führt die synchrone, antidrome Erregung aller linksseitigen α -Motoneurone des Gastrocnemius-Kerns zu phasenhaften Aktivitätsschwankungen benachbarter Interneurone unterschiedlicher Kerngröße. Ausmaß und Zeitverlauf der Kernreaktion hängen von der Ganglienzellgröße und dem Reizweg ab.

Parallel mit der zunehmenden Aktivierung von Neuronen steigt die Gewebsdurchblutung, sichtbar an der allmählichen Eröffnung des gesamten Kapillarbett in der linksseitigen Vorderhornregion der Segmente $L_6\text{--}S_1$ (Maximale Kapillarlänge: etwa $800\ \text{mm}/\text{mm}^3$). Die Verknüpfung der Änderung von Kapillarlänge mit der Kernreaktion bestimmter Neuronentypen durch Berechnung der entsprechenden Korrelationskoeffizienten ergibt, daß die Mehrdurchblutung in der ersten Phase von der Aktivität der antidrom gereizten Motoneurone, in der zweiten Phase von transsynaptisch stimulierten Interneuronen bestimmt wird.

Einleitung

Zwischen der elektrischen Aktivität von Neuronen und ihrem Metabolismus bestehen zeitabhängige Wechselbeziehungen; diese manifestieren sich vor allem in Schwankungen der Nucleinsäure- und Proteinsynthese. Aus diesem Grunde beobachtet man funktionsabhängige Konzentrationsänderungen der entsprechenden Metabolite, die an unterschiedliche Hydrationszustände des Intrazellulär-raums gebunden sind; indirekt wird dadurch das Kern- und Cytoplasmavolumen beeinflusst (Caspersson, 1950). Um das Reaktionsvermögen der Neurone zu studieren, können die genannten voneinander abhängigen Prozesse mit elektrophysiologischen, biochemischen und quantitativ-morphologischen Methoden analysiert werden. Geinisman (1971) stellte fest, daß unter definierten Reizbedingungen (orthodrome Reizung, Reizfrequenz 1 Hz, supramaximale Reizstärke zur Aktivierung von α -Motoneuronen) die RNS-Konzentration in den lumbalen Motoneuronen der Ratte innerhalb von 40 min um 15% abnimmt. Außerdem ist der Stimulationserfolg gekennzeichnet durch eine initiale Zellvolumenvergrößerung (nach 10 min) und eine etwa gleich hohe Volumenabnahme (10%) nach 40 min Reizdauer. Dagegen vermindert sich im gleichen Zeitraum die Kerngröße der Motoneurone kontinuierlich um 10% (Geinisman *et al.*, 1971). Geinisman *et al.* (1971) wählten den orthodromen Reizweg zur Aktivierung der lumbalen α -Motoneurone und erreichten dadurch eine transsynaptische Beeinflussung dieser Zellelemente.

Außer einer orthodromen, transsynaptischen Erregung von Ganglienzellen kann man sie direkt, antidrom durch elektrische Reizung ihrer Axone stimulieren. Diese Möglichkeit der antidromen Aktivierung wurde in eigenen Experimenten ausgenutzt, um eine Differenzierung zwischen den antidrom und orthodrom gereizten Neuronen zu erzielen. Geinisman (1971) konnte zeigen, daß die Abnahme der neuronalen RNS-Konzentration nur nach orthodromer Stimulation eintritt. Weiterhin sollten durch antidrome Reizung die inhibitorischen Interneurone transsynaptisch aktiviert werden (Übersicht s. Eccles, 1969; Hultborn *et al.*, 1968). Der unterschiedliche Aktivierungsweg für Moto- und Interneurone dürfte eine Abgrenzung der mit morphologischen Methoden registrierbaren Reaktionen dieser elektrophysiologisch eindeutig charakterisierten Neuronentypen erleichtern. Um die vermutete differente Reizbeantwortung von Moto- und Interneuronen noch zu verstärken, haben wir die antidrome Reizung auf 8 Std ausgedehnt.

Die Beobachtung des Zusammenspiels von Inter- und Motoneuronen des Gastrocnemius-Kerns, den Kaizawa und Takahashi (1970) bei Ratten abgegrenzt haben, wurde durch Vergleich von Kerngrößenänderungen in beiden Rückenmarkshälften der Segmente L_6 — S_1 ermöglicht. Um zusätzliche Informationen über den Grad der Aktivitätsschwankungen von Neuronenverbänden in den Segmenten L_6 — S_1 während der Langzeitreizung zu erhalten, wurde die enge Abhängigkeit zwischen Durchblutungsgrad und funktionsbedingten Änderungen des Sauerstoffverbrauchs im Hirngewebe ausgenutzt (s. Opitz u. Schneider, 1950). Als Relativmaß für den Grad der Hirndurchblutung gilt die Länge der erythrozytengefüllten Kapillaren (Petrén *et al.*, 1937; Lierse, 1963; Diamond *et al.*, 1964).

Die in bestimmten Phasen der Langzeitstimulation der caudalen Rückenmarkssegmente der Ratte beobachteten Änderungen der Meßparameter (Zellkernfläche von Moto- und Interneuronen, Kapillarlänge) wurden abschließend einer Korrelationsanalyse unterzogen, um Wechselbeziehungen zwischen Moto- und Interneuronen sowie dem Gefäßkompartiment nachzuweisen.

Material und Methoden¹

Geinisman *et al.* (1971) konnten an ihrem Untersuchungsgut zeigen, daß das Kernvolumen der α -Motoneurone in lumbalen Rückenmarkssegmenten der Albinoratte starken Schwankungen unterliegt, die nicht durch meßtechnische Fehler vorgetäuscht werden. Alter, Geschlecht und Gewicht beeinflussen wesentlich die Kerngröße von Neuronen. Außerdem hängt die Kerngröße von tageszeitlichen Aktivitätsphasen der Tiere ab (Kulenkampff, 1964). Auch die Narkoseform muß mitberücksichtigt werden (Krantz, 1947). Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, wurden in unseren Versuchen nur gleichaltrige, männliche, unter gleichen Umweltbedingungen gehaltene Inzuchtratten des Stammes Sprague-Dawley NIH/Han mit einem Körpergewicht von 130—140 g verwendet.

Nach initialer Äthernarkose und anschließender Gabe von 0,04 mg Nembutal®/g Körpergewicht i.p. bestand die Standardpräparation aus dorsaler Laminektomie mit Durchtrennung der linken Hinterwurzeln L_3 — S_1 , Freilegung der linken Nn. gastrocnemii und Durchtrennung des linken N. ischiadicus sowie des linken N. tibialis. Zur Stimulation wurden die beiden linken Nn. gastrocnemii im Ölbad auf die Reizelektroden gelegt und mit einer Frequenz von 1 Hz sowie einer Impulsdauer von 0,1 msec gereizt. Die Reizstärke war supramaximal, um die Axone der Motoneurone im Gastrocnemius-Kern zu stimulieren. Der Stimulationserfolg wurde am peripheren Ende der durchtrennten Hinterwurzel L_6 oder L_7 überprüfte (Reizanordnung s. Abb. 1) und mußte über die gesamte Beobachtungszeit nachweisbar sein. Zur Konstanthaltung der Narkosetiefe während der Langzeitreizung über 8 Std erhielten die Tiere 0,06 mg Nembutal®/g Körpergewicht i.m. in 3 Std-Intervallen. Kontrolltiere wurden gleichartig präpariert und unter gleicher Narkose bis zu 8 Stunden in die Halterung des Reizapparates eingespannt.

Zur cytometrischen Untersuchung wurden in einstündigen Abständen die Rückenmarkssegmente L_6 — S_1 von je 4 Tieren, die den obengenannten Kriterien entsprachen, für 24 Std in Bouinscher Lösung fixiert. Die Gewebesentnahme fand zwischen 10.00 und 17.00 Uhr statt, also außerhalb der beiden Aktivitätsmaxima dieser Tierart, die bei 8.00 und 1.00 Uhr liegen (Kulenkampff, 1964). Anschließend wurde das Gewebe unter Standardbedingungen in Paraplast eingebettet und in 10 μ m dicke Serienschnitte zerlegt. Die Färbung erfolgte mit einer modifizierten und ebenfalls standardisierten Trichromfärbung (Zimmermann, 1967). Die Kernfläche von Moto- und Interneuronen wurde mit dem Punktzählverfahren (Rasterpunktabstand 1,50 μ m) oder durch Vergleich mit genormten Kreisflächen (Fischmeister, 1967) bei 1250facher Vergrößerung bestimmt. Nur Zellkerne mit einem deutlichen Nucleolus und einem hellen Nucleoplasma sowie randständig kondensiertem Chromatin wurden Neuronen zugerechnet. Als weitere Grenzbedingung galt, daß die Neurone ventral von einer Linie liegen mußten, die durch die dorsale Begrenzung des Zentralkanals verlief (Abb. 1).

1 Frl. D. Vaihinger sei für die Ausführung der graphischen Arbeiten gedankt.

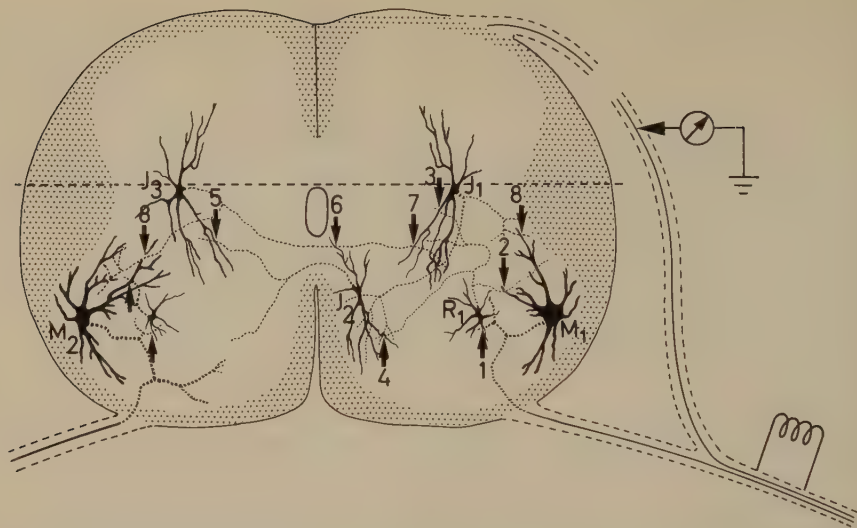


Abb. 1. Rückenmarksquerschnitt, Ratte. Versuchsanordnung: Auf der Reizelektrode liegen medialer und lateraler linker N. gastrocnemius. Kontrolle der antidromen Impulsweiterleitung am peripheren Ende der durchtrennten Hinterwurzel L_6 od. L_7 . Die Kernflächenmessung der Neurone in den Segmenten L_6 — S_1 (Gastrocnemius-Kern) erfolgte ventral einer durch die dorsale Begrenzung des Zentralkanals gezogenen Linie (— — —). Ganglienzellen, die unter den angegebenen Versuchsbedingungen direkt antidrom oder transsynaptisch aktivierbar sind, wurden in Anlehnung an Scheibel und Scheibel (1966, 1969) halbschematisch dargestellt (Dendriten durchgezogen, Axone gestrichelt). M_1 ipsilaterales α -Motoneuron (antidrom aktivierbar); $\uparrow_1$ Axonkollaterale von M_1 mit Synapsenkontakt an Renshaw-Zelle (R_1); $\uparrow_2$ klassischer recurrenter Inhibitionsweg; $\uparrow_3$ Axodendritische Synapse zwischen R_1 und Ia-inhibitorischen Interneuronen (I_1); $\uparrow_4$ Axodendritische Kontaktmöglichkeiten von Renshaw-Zellen (R_1), Interneuronen (I_1) und Commissurenzellen (I_2). $\uparrow_5$ Synapsenverknüpfung zwischen Axonkollateralen von Commissurenzellen (I_2) mit kontralateralen Interneuronen (I_3); $\uparrow_{6-8}$ ipsi- und kontralaterale axodendritische Synapsen zwischen Interneuronen (I_1, I_2, I_3) und Motoneuronen (M_2)

Voruntersuchungen ergaben in den Segmenten L_6 — S_1 eine zweigipfelige Kerngrößenverteilung der Neurone (vgl. Schädé, 1964). Das Minimum zwischen beiden Häufigkeitsgipfeln lag bei einer Kernfläche von $150 \mu m^2$; dieser Wert wurde daher als Grenze zur cytommetrischen Differenzierung zwischen Inter- und Motoneuronen verwandt. Daraus folgt, daß die Durchmesser der Interneurone kleiner sind als die Schnittdicke von $10 \mu m$; der sog. Holmes-Effekt ließ sich weitgehend dadurch kompensieren, daß bei Vorliegen eines Nucleolus das größtmögliche Kernprofil durch Fokussierung eingestellt wurde (vgl. Treff, 1963). Für die Motoneurone mußte zunächst geklärt werden, wieviele Kerne einen stark exzentrischen Nucleolus besitzen. Zur Erzielung einer 95%igen Meßgenauigkeit der Kernfläche gilt eine Exzentrizität des Nucleolus bis zu $5 \mu m$ bei Annahme eines sphäroiden Zellkerns und eines mittleren Kerndurchmessers von $17 \mu m$ (vgl. Pannese *et al.*, 1972). Es zeigte sich, daß Kontrolltiere und Tiere nach Langzeitstimulation höchstens 8—10% Motoneurone mit einer Exzentrizität des Nucleolus von mehr als $5 \mu m$ vom Zentrum aufwiesen. Die Konstanz dieses prozentualen Anteils während der Langzeitreizung ließ somit einen Vergleich der Meßwerte in einstündigen Zeitintervallen zu. Pro Tier und Rückenmarkshälfte wurden nie weniger als 100 Moto- bzw. 200 Interneuron-Kerne gemessen. Eine Umrechnung der gewonnenen Flächenwerte (μm^2) in Kernvolumina erscheint nicht sinnvoll, da "the conversion of linear measurement into volumes would seem to have only the negative merit of cubing the error"

(Rather, 1958). Außerdem sind die geplanten Vergleiche der Kerngrößenänderungen in verschiedenen Zeitintervallen ebensogut mit den errechneten Kernflächen möglich.

Die Bestimmung der Kapillarlänge erfolgte durch Zählung der erythrozytengefüllten Kapillardurchtritte (P_A) durch die Meßfläche von 0,1225 mm² bei 290facher Vergrößerung nach der Formel

$$L_{Vc} = 2 P_A \text{ (mm/mm}^3\text{)} \text{ (Smith und Guttman, 1953).}$$

50 Messungen pro Tier und Rückenmarkshälfte genügten, um eine Konstanz der Varianz bei fortlaufender Mittelwertbildung zu erreichen. Die Darstellung der Kapillaren mit Hilfe der intrakapillären Erythrocytenanfärbung wurde gewählt, weil diese Methode besser reproduzierbare Ergebnisse liefert als z. B. die Injektionsmethoden mit Tusche oder Farbstoffen (vgl. Diamond *et al.*, 1964). Außerdem sollten die intrakapillären Erythrozyten als Indikatoren für eine geöffnete Kapillarstrecke dienen und somit Informationen über den aktuellen Durchblutungsgrad liefern.

Statistik. Die Meßwerte wurden zunächst auf Homogenität innerhalb der 4 Versuchstiere eines Zeitintervalls mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse überprüft (Sachs, 1972). Anschließend wurden die Mittelwerte homogener Tiergruppen aufeinanderfolgender Zeitintervalle auf Unterschiede mit dem *t*-Test für unverbundene Stichproben ($\alpha = 0,05$) untersucht. Abschließend wurden die Kernflächenwerte mit dem *t*-Test für verbundene Stichproben ($\alpha = 0,05$) auf rechts-links-Differenzen verglichen. Die Korrelationskoeffizienten wurden aus den prozentualen Meßwertänderungen (Kontrollwert = 100%) errechnet und ebenfalls auf Signifikanz gegenüber „0“ getestet ($\alpha = 0,05$).

Befunde

Unter physiologischen Bedingungen zeigen Kerngrößenänderungen funktionsabhängige Aktivitätsschwankungen der Neurone an (vgl. Benninghoff, 1950). Nach orthodromer Reizung über 40 min beobachteten Geinisman *et al.* (1971) im Lumbalmark der Ratte eine Abnahme des Kernvolumens von Motoneuronen. Dieser Befund ist der Ausgangspunkt der eigenen Studie, in der die Kerngrößen-schwankungen nicht nur zur Analyse des Reaktionsvermögens von Motoneuronen, sondern auch für den Nachweis von Wechselbeziehungen zwischen Inter- und Motoneuronen herangezogen werden sollen. Im linken Vorderhorn der Rückenmarkssegmente L₆—S₁ der Ratte reagieren die Motoneurone auf antidrome Reizung der linken Nn. gastrocnemii mit einer Abnahme ihrer Kernfläche von 10—15% im Intervall zwischen der 1. und 2. Std nach Versuchsbeginn, um sich zwischen der 3. und 4. Std wieder dem Ausgangswert zu nähern. Auf dieser Phase der Kerngrößenzunahme folgt eine erneute Abnahme der Kernfläche um 5—6% gegenüber dem Kontrollwert, die bis zur 6. Std andauert (vgl. Abb. 2).

Die mittlere Kerngröße der motorischen Vorderhornzellen der korrespondierenden rechten Rückenmarkshälfte ändert sich — verglichen mit der Kontrollgruppe — nicht signifikant bis zu 5 Std nach Reizbeginn. Man beobachtet aber eine starke Streuung der Meßwerte zwischen den Tieren eines Kollektivs im 2 Std- und 6 Std-Intervall (s. Abb. 2). In der 3. Std nach Versuchsbeginn pendeln sich die Schwankungen der Kerngröße kontralateraler Motoneurone auf einen Mittelwert ein, der mit der Kontrollgruppe übereinstimmt. Nach 7stündiger Reizdauer mißt man jedoch eine Verkleinerung der Kernfläche der großen Neurone um 8—10%. Im Verlauf einer weiteren Stunde ist eine Abweichung vom Kontrollwert nicht mehr nachweisbar (Abb. 2).

Diese nach einer Latenzzeit von 6 Std meßbare Übertragung der neuronalen Erregbarkeit von den direkt antidrom gereizten Motoneuronen der linken Rückenmarkshälfte auf das entsprechende Kerngebiet der Gegenseite ist nur durch

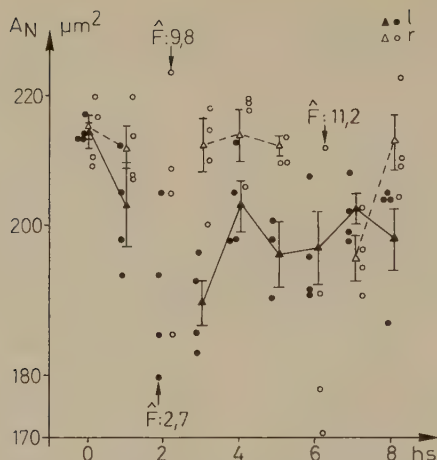


Abb. 2. Kerngrößenänderungen an Motoneuronen (Kernfläche $> 150 \mu\text{m}^2$) in den Segmenten $\text{L}_6\text{—S}_1$ der Albinoratte während antidromer Stimulation der linken Nn. gastrocnemii über 8 Stunden. Signifikante Abnahme der Kernfläche (A_N) ipsilateraler Motoneurone (l: ● Mittelwert eines Tieres, ▲ Mittelwert der Tiergruppe mit Streuung der Mittelwerte der Einzeltiere um den Gruppenmittelwert) nach 3tündiger Dauerreizung. Signifikante Verkleinerung der Kernfläche großer kontralateral gelegener Neurone (r: ○, △) erfolgt erst nach 7stündiger Reizung ($\hat{t}_{0,05} = 6,5$ zwischen den Gruppenmittelwerten der 5. und 7. Std)

Zwischenschaltung von Interneuronen möglich. Zur Prüfung dieser Annahme wurden alle Neurone mit einer Kernfläche $< 150 \mu\text{m}^2$ ausgewertet, die im Querschnitt durch beide Rückenmarkshälften der Segmente $\text{L}_6\text{—S}_1$ in den Zonen VII, VIII und IX nach Rexed (1964; vgl. S. 231) lagen. Innerhalb der 1. Stunde einer antidromen Stimulation linksseitiger Gastrocnemius-Motoneurone tritt eine etwa 8%ige Kernflächenvergrößerung von Interneuronen in beiden Rückenmarkshälften auf. Während kontralateral zur Reizung der Ausgangswert schon nach 2 Std wieder erreicht wird, beobachtet man diesen Rückgang auf der stimulierten Seite erst nach 3 Std (Abb. 3).

Die Darstellung der Kernflächenwerte in Form einer Verteilungskurve (Abb. 4) zeigt, daß in der 1. Std das angedeutete (nicht signifikante) erste Maximum bei $40 \mu\text{m}^2$ verschwindet und dafür die Häufigkeit der Interneurone mit einer Kernfläche von $50 \mu\text{m}^2$ zunimmt. Somit scheinen die kleinsten neuronalen Elemente beider Rückenmarkshälften zuerst auf den antidromen Stimulus zu reagieren (Diskussion s. S. 242—243). Zwischen der 3. und 4. Std nach Reizbeginn nimmt die Kernfläche der Interneurone beiderseits stetig zu. Das zweite Kernflächenmaximum (24%ige Vergrößerung gegenüber der Kontrollmessung) wird rechts schon in der 6. Std erreicht, während links auch nach 8stündiger Stimulation die Kerngrößenzunahme noch fortschreitet. Diese zweite Phase der Kernvergrößerung ist stärker ausgeprägt als die erste. Die Verteilungskurven (Abb. 4) des 5- und 6stündigen Reizintervalls weisen darauf hin, daß allmählich größere Interneurone mit einer Kernflächenzunahme auf die antidrome Stimulation antworten. Das Maximum verschiebt sich gegen einen Kernflächenwert von $70 \mu\text{m}^2$, und die anfänglich breitbasige Verteilungskurve wird zunehmend schmäler. Die beobach-

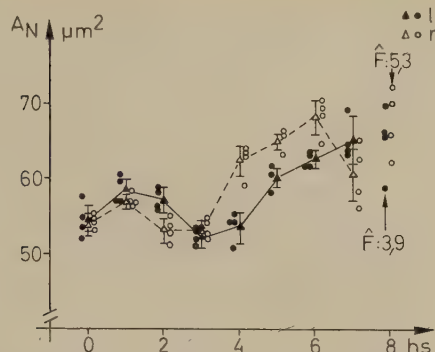


Abb. 3. Kerngrößenänderungen an Interneuronen (Kernfläche $< 150 \mu\text{m}^2$) in den Segmenten $\text{L}_6\text{--S}_1$ der Albinoratte während antidromer Stimulation der linken Nn. gastrocnemii über 8 Std. Die Kernfläche nimmt nach einer Stunde geringgradig (8–10%) ipsi- und kontralateral zur Nervenreizung zu ($t_{0,05} = 5,33$ für Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten der linken und $t_{0,05} = 5,69$ für Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten der rechten Seite). Zwischen der 3. und 6. Std vergrößern sich die Zellkernflächen kontralateraler Interneurone bis zu 25% gegenüber dem Kontrollwert, während ipsilateral das Maximum auch nach 8stündiger Stimulation noch nicht erreicht ist. Eine Erklärung für das frühzeitige Ansprechen von Interneuronen der rechten Rückenmarkshälfte konnte nicht gefunden werden. Bezeichnungen wie in Abb. 2

tete Phasenverschiebung zwischen der Reaktionsweise von rechts- und linksseitigen Interneuronen wird nach 7stündiger Reizdauer noch deutlicher. Während in der linken Hälfte der Segmente $\text{L}_6\text{--S}_1$ die Kernvergrößerung andauert, nimmt die Kernfläche der rechtsgelegenen Interneurone um 8% gegenüber dem Wert der vergangenen Stunde ab.

Ausgehend von den Größenschwankungen der antidrom gereizten Motoneurone im Kerngebiet der Mm. gastrocnemii können mit Hilfe der Korrelationsanalyse folgende interneuronale Wechselbeziehungen nachgewiesen werden (Abb. 5):

1. Die Kerngrößenänderungen von linksseitigen Moto- und Interneuronen korrelieren sowohl im untersuchten 1stündigen als auch im 6stündigen Intervall gut miteinander.

2. Anfänglich sind die Reizreaktionen von links- und rechtsseitigen Interneuronen nur schwach korreliert. Nach 6stündiger Stimulation beobachtet man gleichgerichtete Wechselbeziehungen zwischen linksseitigen Inter- und Motoneuronen sowie zwischen den Interneuronen beider Rückenmarkshälften. Der Synchronisationseffekt der Dauerreizung hat zur gleichartigen Reaktionsweise vieler Ganglienzellen geführt.

3. Parallelen zwischen dem Reaktionsvermögen linksseitiger Motoneurone und kontralateraler Interneurone sind erst relativ spät zu beobachten (nach 3stündiger Reizdauer). Durch Zwischenschaltung mehrerer Interneurone werden die antidrom über Axonkollateralen ausgelösten Reizeffekte stark verzögert.

Die Befunde weisen darauf hin, daß im Verlauf der Langzeitreizung immer mehr Interneurone beider lumbalen Rückenmarkshälften aktiviert werden. Diese neuronale Aktivitätssteigerung wird begleitet von einer Zunahme der durch-

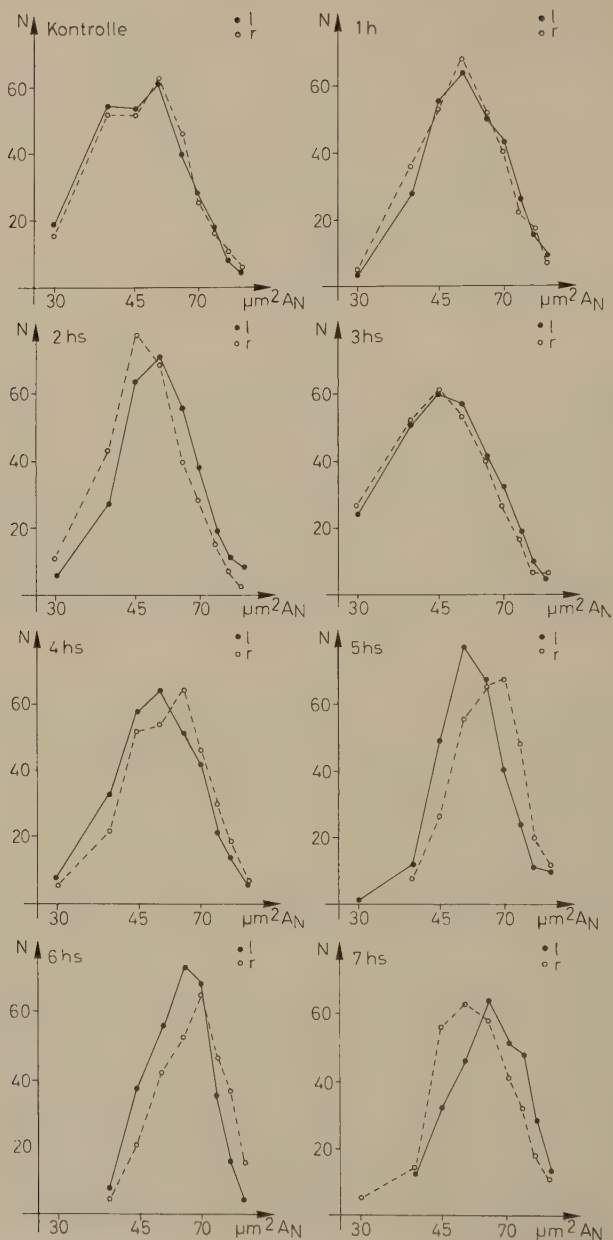


Abb. 4. Verteilungskurven der Kernflächen von Interneuronen in linken (●) und rechten (○) Hälften der Rückenmarkssegmente L₆–S₁. Stimulationszeitraum: 7 Stunden. In der 8. Stunde beobachtet man eine starke Streuung der Meßwerte zwischen den Tieren eines Kollektivs; daher wurde dieses Intervall nicht mit berücksichtigt. In der 1. Std (1 h) verringert sich die Zahl der kleinen Interneurone mit einer Kernfläche < 40 μm². Von der 4. Std ab verschiebt sich das Kerngrößenmaximum von Interneuronen gegen einen Flächenwert von 70 μm². Kernflächen im logarithmischen Maßstab aufgetragen

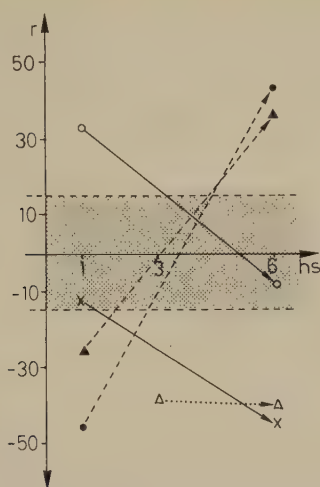


Abb. 5. Änderung der Korrelationskoeffizienten in der a) 1. Std, b) 1.—3. Std, c) 3.—4. Std und d) 4.—6. Std nach Beginn der Dauerstimulation. Die Korrelationskoeffizienten wurden aus den paarweise zugeordneten prozentualen Abweichungen der Kernflächen von Moto- und Interneuronen sowie der Kapillarlängen a) von den Meßwerten bei Kontrolltieren (100%), b) von denen bei 1 Stunden-Tieren (100%), c) von denen bei 3 Stunden-Tieren (100%) und d) von denen bei 4 Std-Tieren (100%) errechnet. ● Korrelation der Kernflächenänderungen von linksseitigen Moto- und Interneuronen; ▲ Korrelation der Kernflächenänderung von links- und rechtsseitigen Interneuronen; ○ Korrelation zwischen den Änderungen der Kernfläche linksseitiger Motoneurone und der Kapillarlänge. × Korrelation der Änderungen von Kernfläche linksseitiger Interneurone und der Kapillarlänge. △ Korrelation der Kernflächenänderung von linksseitigen Motoneuronen und kontralateralen Interneuronen

bluteten Kapillarstrecken in den Segmenten L_6 — S_1 (Abb. 6). Initial vergrößert sich die Kapillarlänge links stärker als rechts bis zur 2. Std nach Reizbeginn. Während im linken Rückenmarksabschnitt die Kapillarlänge stetig zunimmt, beobachtet man rechts zwischen der 2. und 3. Std einen Rückgang auf den Kontrollwert; anschließend steigt auch in den rechten Segmenten die Kapillardurchblutung allmählich an. Abb. 7 zeigt die deutliche Vermehrung der erythrocytengefüllten Gefäßstrecken im linken Vorderhorn der Segmente L_6 — S_1 . Hieraus folgt, daß der Abstand zwischen durchbluteten Kapillarstrecken immer kürzer wird und somit die Austauschstrecke zwischen Kapilliarwand und Ganglienzelle abnimmt (Abb. 8). Außerdem entwickeln sich zunehmend günstigere Relationen zwischen Neuronen- und Kapillaroberfläche.

Die Korrelationsanalyse ergibt, daß die Mehrdurchblutung des Rückenmarksgewebes zunächst durch die Aktivitätssteigerung der antidrom gereizten Motoneurone hervorgerufen wird (Abb. 5). Später werden immer mehr Interneurone durch die synchrone Dauerreizung über die Nn. gastrocnemii erfaßt. Nach 6stündiger Stimulation korreliert deshalb die Kernflächenzunahme der linksgelegenen Interneurone gut mit der Eröffnung weiterer Kapillarstrecken.

Die antidrome Langzeitstimulation der Neurone in den Segmenten L_6 — S_1 von Albinoratten über die linken Nn. gastrocnemii beeinflusst zunächst die ipsilateralen Motoneurone des Gastrocnemius-Kerngebiets. Gleichzeitig werden in

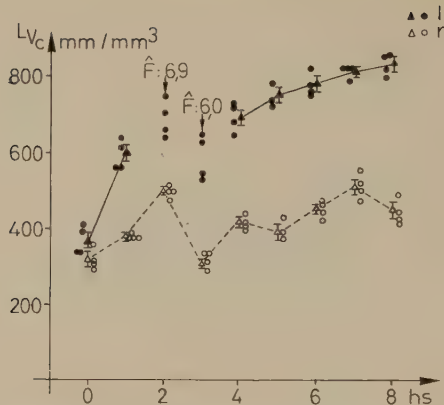


Abb. 6. Kapillarlängenänderung in den Rückenmarkssegmenten L_6-S_1 während der 8stündigen Dauerstimulation. Allmähliche Eröffnung des gesamten intramedullären Kapillarbett (Maximalwert der Kapillarlänge (L_{Vc}): 800 mm/mm³) im Bereich des linken Vorderhorns. Auch im kontralateralen korrespondierenden Abschnitt Zunahme der Durchblutung. Bezeichnungen s. Abb. 2

der ersten Phase (1.—3. Std) transsynaptisch kleinkernige Interneurone in beiden Rückenmarkshälften aktiviert. In der zweiten Phase (5.—7. Std) werden ipsi- und kontralaterale Interneurone mit größerer Kernfläche in die Reizausbreitung einbezogen. Erst nach 7stündiger Dauerreizung sprechen auch große Neurone an, die kontralateral zur direkt gereizten Rückenmarkshälfte liegen. Die zunehmende Rekrutierung von Neuronen führt zu einem Sauerstoffmehrverbrauch in den aktivierten Rückenmarksabschnitten, der im Verlauf der 8stündigen Stimulation an der allmählichen Eröffnung des gesamten intramedullären Kapillarbett erkennbar ist.

Diskussion

Exzitatorische und inhibitorische Membranprozesse bedingen einen energieverbrauchenden Ionentransport zur Wiederherstellung der intrazellulären Homöostase. Der Zellmetabolismus wird dadurch vor allem im Verlauf der Dauerstimulation nachhaltig beeinflusst. Kogan (1968) beobachtete, daß der RNS-Gehalt in Motoneuronen des *M. semitendinosus* und seines durch Auflösung des Flexor-Reflexes gehemmten Antagonisten gegenläufigen Konzentrationsschwankungen unterliegt: Auf eine initiale Abnahme der RNS in den erregten Motoneuronen des *M. semitendinosus* folgte 5 min nach Reflexbeginn eine Zunahme des RNS-Gehaltes, während in den inhibierten Motoneuronen des *M. quadriceps* eine umgekehrte Relation der RNS-Konzentration vorlag. Diese Ergebnisse lassen erkennen, daß sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Membranprozesse in den neuronalen RNS-Stoffwechsel eingreifen. Somit reicht die Messung der RNS-Konzentration allein nicht aus, um den Aktivierungszustand eines Neurons zu beurteilen. Mit gleichem Vorbehalt müssen die gemessenen Kerngrößenänderungen interpretiert werden. Eine Entscheidung, ob ein Neuron überwiegend hemmenden oder fördernden Einflüssen unterliegt, ist allein aus der Kernflächen-

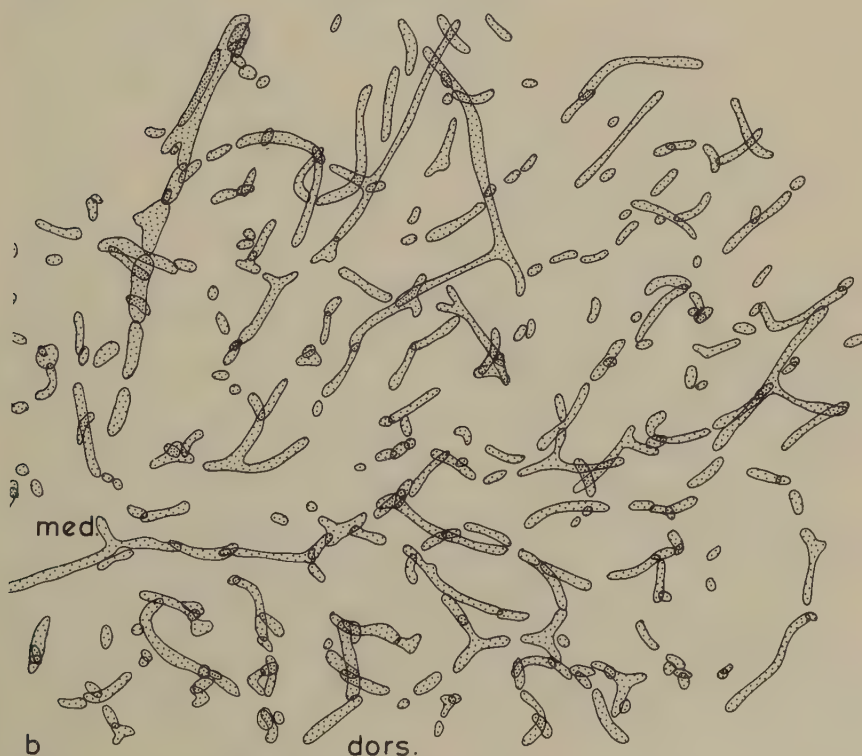
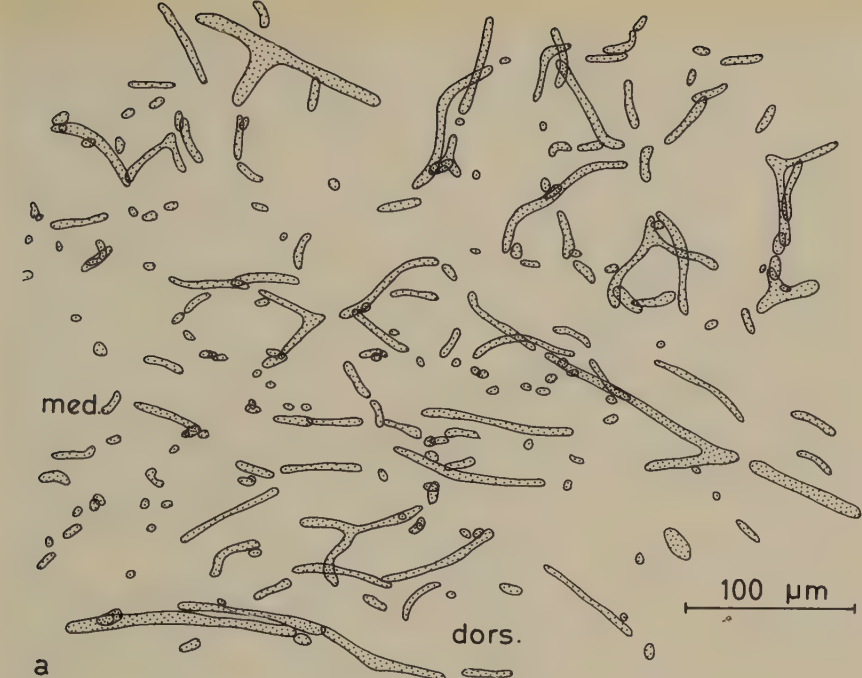


Abb. 7a und b. Umzeichnung der erythrocytengefüllten Gefäßstrecken in entsprechenden linksseitigen Vorderhornabschnitten aus 6 aufeinanderfolgenden Serienschnitten. a) Kontrolltier; b) nach 7stündiger Stimulation

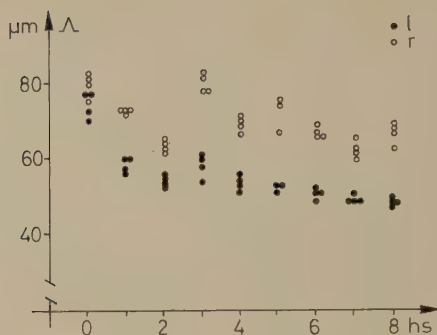


Abb. 8. Kapillarabstand (Δ) in den linken (●) und rechten (○) Vorderhornabschnitten der Segmente L_6-S_1 . Mit zunehmender Aktivierung der Moto- und Interneurone durch die Dauerstimulation verkürzt sich der mittlere Abstand zwischen benachbarten Kapillaren

bestimmung, auch bei Beachtung der Zeitabhängigkeit des nukleären Hydrationsprozesses, nicht möglich. Aus diesem Grunde dienten Kerngrößenänderungen in unserer Studie nur als Parameter, um mit cytometrischer Methodik nach Wechselbeziehungen zwischen Neuronen verschiedener Größenklassen zu fahnden.

Durch antidrome Langzeitreizung über die Nn. gastrocnemii läßt sich eine allmähliche und gezielte Synchronisation der neuronalen Aktivität im entsprechenden motorischen Kerngebiet erreichen. Neurone unterschiedlicher Kerngröße reagieren nach bestimmten Latenzzeiten mit unterschiedlichen Kerngrößenänderungen. Dieses Verhalten dürfte von elektrophysiologischen, biochemischen und morphologischen Eigenschaften der stimulierten Ganglienzellen abhängen:

1. dem gewählten Reizweg (orthodrom-antidrom) und der Anzahl der vorgegeschalteten Neurone,
2. den elektrischen Parametern des stimulierten Zelltyps (z. B. Erregbarkeitsschwelle, tonische oder phasische Antwort), die von Enzymbesatz und Strukturbesonderheiten (Zelloberflächengröße, Synapsenzahl, Verzweigungsmuster des Dendritenbaums und Axons) beeinflußt werden.

Die Leitungsgeschwindigkeit ändert sich proportional mit dem Axonkaliber. Da Axondurchmesser und zugehörige Neuronengröße eng positiv korrelieren, ist zu erwarten, daß durch antidrome Reizung in erster Linie die großen α -Motoneurone aktiviert werden (Henneman *et al.*, 1965). Demgegenüber sind zur antidromen Stimulation von kleinen γ -Motoneuronen höhere Reizenergien erforderlich. Im Gegensatz zur antidromen Erregung von Motoneuronen führt die orthodrome Reizung transsynaptisch zur Neuronenaktivierung; diese hängt von den Membraneigenschaften der Ganglienzelloberfläche ab. Nach Henneman *et al.*, (1965) besteht umgekehrte Proportionalität zwischen Zellgröße und transsynaptischer Erregbarkeit; somit werden über den orthodromen Reizweg vorwiegend kleine Neurone aktiviert. Auch durch antidrome Stimulation eines Motoneurons gelingt es, andere Neurone über Axonkollateralen transsynaptisch zu erregen. Dieser von Renshaw (1940) und Eccles *et al.*, (1954) beschriebene Reizweg erfaßt Interneurone (Renshaw-Zellen), die zu den kleinsten Neuronen des Rückenmarks

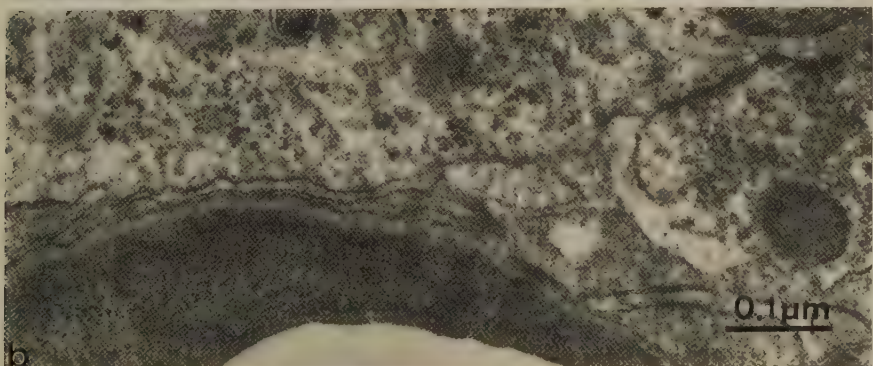
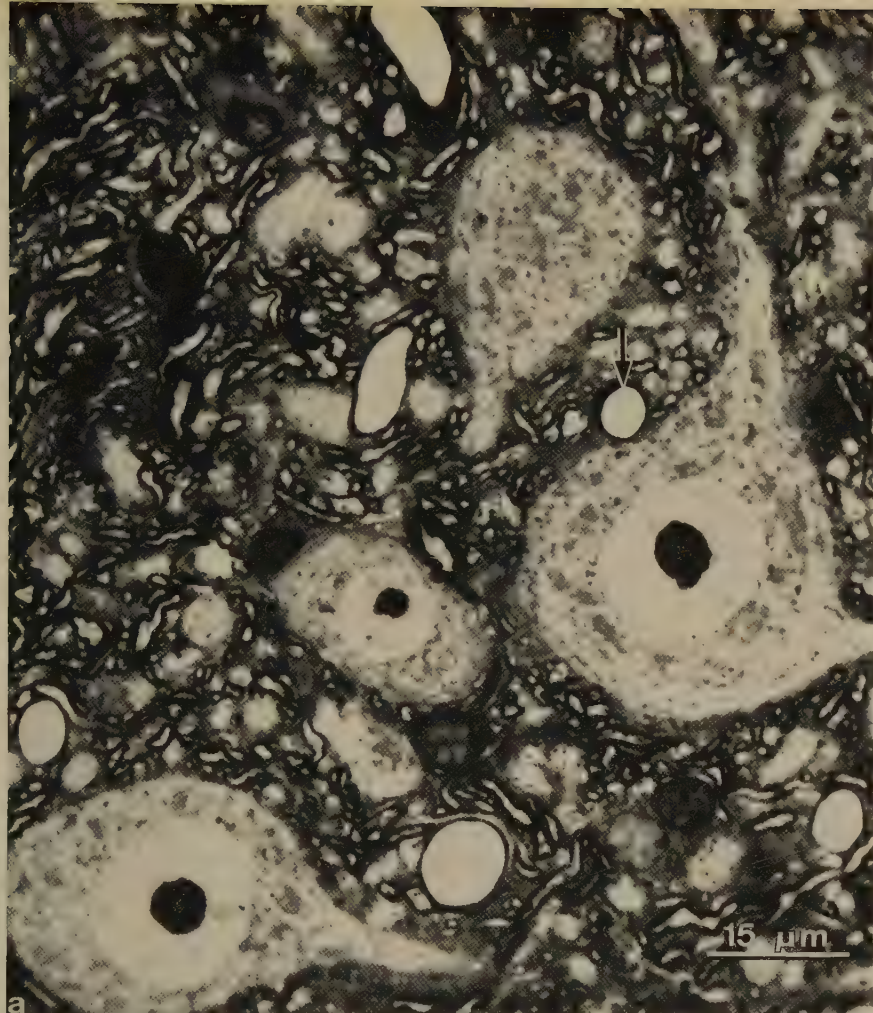


Abb. 9a und b. Neuronengruppe aus dem linken Vorderhorn der Albinoratte. Perfusionsfixation (Glutaraldehyd, Cacodylatpuffer). a) Semidünnschnitt (Durcupan). Toluidinblaufärbung. ↑ Enger Kontakt zwischen Kapillare und Ganglienzelle. Vergr. 1300×. b) Ausschnittvergrößerung der Kontaktstelle (↑). Nur eine dünne Gliallamelle schiebt sich zwischen Endothel und Ganglienzelle. ↑ Axo-somatische Synapse. Vergr. 140000×

gehören und medioventral in enger Nachbarschaft zur Rexedschen Zone IX liegen (Jankowska und Lindström, 1971). Die im eigenen Experiment zur antidromen Stimulation von Gastrocnemius-Motoneuronen verwendete supramaximale Reizstärke führt wahrscheinlich über deren Axonkollateralen zur massiven Erregung von Renshaw-Zellen. Ross *et al.* (1972) berichteten über eine direkte Proportionalität zwischen der Aktivität von Motoneuronen und dem inhibitorischen Einfluß der recurrent stimulierten Renshaw-Zellen. Außerdem wurde eine starke Konvergenz synaptischer Einflüsse auf Renshaw-Zellen mehrfach nachgewiesen (vgl. Eccles, 1969; Ryall, 1972). Die leichte transsynaptische Erregbarkeit und die hohe Entladungsfrequenz dieses Neuronentyps wird durch eine hohe intramitochondriale Aktivität oxydativer Enzyme gewährleistet (Campa und Engel, 1971). Die geschilderten Eigenschaften der Renshaw-Zellen stimmen gut mit der eigenen Beobachtung überein, daß zuerst die kleinsten Elemente der Interneuronenpopulation mit einer Kernflächenzunahme auf die antidrome Reizung antworten (vgl. Abb. 4).

Der Kernvergrößerung von Renshaw-Zellen steht die Abnahme der Kerngröße benachbarter α -Motoneurone gegenüber. Die differente Reaktion beider Zelltypen auf den gleichen Stimulus läßt sich mit ihrem unterschiedlichen Aktivierungsmodus erklären: Die Zellmembran der motorischen Vorderhornneurone des linksseitigen Gastrocnemius-Kerns wird von dem antidromen Reiz direkt depolarisiert, während der gleiche Stimulus Renshaw-Zellmembranen nur über synaptische Transmitterfreisetzung erregen kann. Letztere Aktivierungsmöglichkeit würde der orthodromen Stimulation entsprechen.

Die Exzitation der Renshaw-Zellen im Gebiet der antidrom aktivierten α -Motoneurone des linken Gastrocnemius-Kerns führt einerseits zur direkten recurrenten Hemmung dieser Motoneurone (vgl. Eccles, 1969), andererseits breitet sich der inhibitorische Einfluß der Renshaw-Zellen auf benachbarte Interneurone aus:

1. Eine gegenseitige Hemmung von Renshaw-Zellen ist besonders ausgeprägt zwischen solchen Zellelementen, die durch gleiche Motoraxon-Kollateralen aktiviert werden (Ryall, 1970).

2. Renshaw-Zellen hemmen inhibitorische Interneurone der Zone VII, die über Ia-Muskelafferenzen stimulierbar sind (Hultborn *et al.*, 1968; Ryall und Piercey, 1971).

Die Markierungsversuche von Jankowska und Lindström (1972) beweisen, daß die Ia-inhibitorischen Interneurone größer als Renshaw-Zellen sind. Wahrscheinlich gehört dieser Zelltyp zu den größeren Interneuronen, die nach einer Latenzzeit von 3—4 Std mit einer Kernvergrößerung auf die über Renshaw-Zellen in inhibitorische Impulse verwandelte Dauerreizung ansprechen (Abb. 4). Die großen Interneurone gehören zu einer sehr inhomogenen Zellgruppe. Frank und Fuortes (1956) sowie Wall (1967) unterteilten sie in 3 Typen entsprechend ihrer Reiz-Reaktionszeit und der Dauer ihrer Salvenentladung. Das unterschiedliche Reizverhalten dieser Interneurone hängt eng mit ihren synaptischen Kontaktmöglichkeiten zusammen, die vom Verzweigungsmuster ihres Dendritenbaums und Axons bestimmt werden (Cajal, 1911; Scheibel und Scheibel, 1966; Matsushita, 1970). Die genannten Autoren beschreiben Interneurone mit zweier oder dreidimensionaler Dendritenverzweigung (vgl. Abb. 12 in Scheibel und Scheibel, 1969). Der letztgenannte Verzweigungstyp garantiert eine größere

Konvergenz von Informationen und führt dadurch zu einer stärkeren Beeinflussbarkeit dieses Interneurons.

Scheibel und Scheibel (1966) sowie Matsushita (1970) weisen auf die Ausbreitung der Dendriten und Axone von Interneuronen in der medialen Zone VII und der Zone VIII zur Gegenseite hin und stützen die Annahme, daß Leitungsbahnen zur Reizübertragung von den antidrom transsynaptisch stimulierten Renshaw-Zellen zur kontralateralen Rückenmarkshälfte existieren. Die synaptischen Kontaktmöglichkeiten zwischen Inter- und Motoneuronen auf beiden Seiten der Segmente L_6-S_1 sind in Anlehnung an Scheibel und Scheibel (1966, 1969) in Abb. 1 schematisch dargestellt und mit Pfeilen markiert. Die Suche von Ryall *et al.* (1971) nach Hemmwirkungen von Renshaw-Zellen auf kontralaterale Motoneurone blieb bisher erfolglos. Diese Autoren schließen jedoch eine inhibitorische Einflußnahme von Renshaw-Zellen auf andere Neurone der Gegenseite nicht aus. Möglicherweise sind die in unserem Material an Neuronen mit einer Kernfläche über $150 \mu m^2$ in rechtsseitigen Vorderhornabschnitten der Segmente L_6-S_1 gemessenen Kerngrößenabnahmen nicht α -Motoneuronen sondern großen Interneuronen oder Strangzellen vom Typ der Cooper-Sherrington-Zellen zuzurechnen (vgl. Romanes, 1964). Obwohl die genaue Typisierung der großen kontralateralen Ganglienzellen nicht möglich ist, scheinen diese ein ähnliches Reizverhalten zu zeigen, wie die ipsilateralen antidrom stimulierten Motoneurone der gleichen Kerngrößenklasse. Sie reagieren nach 6stündiger kontralateraler Dauerreizung mit einer Kerngrößenabnahme von 8–10% (Abb. 2). Dieser Wert stimmt mit den von Geinisman *et al.* (1971) publizierten Daten überein. Die nach direkter antidromer Reizung beobachtete Abnahme der Kernfläche von α -Motoneuronen liegt bei 10–15% und stellt unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Grenze für die Verkleinerung der Zellkerne dar (Abb. 2). Demgegenüber dürfte die obere Grenze der funktionsbedingten Kernvergrößerung bei 20–25% zu liegen (Abb. 3). Jedoch wurden unter anderen experimentellen Voraussetzungen auch höhere Werte der Kerngrößenschwankungen gemessen (vgl. Palkovits und Fischer, 1968).

Auch die Kapillarlänge als Parameter zur Beurteilung der Gewebedurchblutung nähert sich asymptotisch einem Grenzwert. Nach 6stündiger Dauerstimulation beobachtet man nur noch geringfügige Abweichungen von einem Mittelwert, der bei 800 mm/mm^3 liegt. Dieser Wert entspricht den von Craigie (1933) publizierten Daten über die Gesamtlänge aller Kapillaren im Rückenmark von Albinoratten (Vorderhorn: 720 mm/mm^3 ; Hinterhorn: 807 mm/mm^3). Die maximale Erweiterung des intramedullären Kapillarbetts verkürzt die Abstände zwischen Gefäß und Nervenzelle so stark, daß der Metabolitenaustausch nur noch durch wenige dünne Glialamellen begrenzt wird (Abb. 9a u. b). Die Effektivität dieses Regulationsvorgangs wird dadurch gesteigert, daß die Ganglienzellen nicht im Zentrum eines von Kapillaren umschlossenen Gewebsabschnitts liegen, sondern mindestens an einer Stelle ihres Perikaryons enge Beziehungen zu Kapillaren aufweisen.

Die cytometrischen Untersuchungen haben gezeigt, daß bestimmte Zelltypen eines Neuronenverbandes durch synchronisierende Langzeitstimulation zu spezifischen, phasenhaften Aktivitätsschwankungen angeregt werden. Dieses Reaktionsmuster gibt Auskunft über die funktionelle Koppelung der verschiedenen

Neuronentypen innerhalb des Zellverbandes. Außerdem können die morphologisch erkennbaren Grenzen des neuronalen Reaktionsvermögens und seine Abhängigkeit von der Anpassungsfähigkeit des intramedullären Gefäßkompartiments bestimmt werden.

Literatur

- Benninghoff, A.: Funktionelle Kernschwellung und Kernschrumpfung. *Anat. Nachr.* **1**, 50—52 (1950)
- Cajal, S.R.Y.: *Histologie du système nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, vol. 1. Paris: Maloine 1911
- Campa, J.F., Engel, W.K.: Histochemical and functional correlations in anterior horn neurons of the cat spinal cord. *Science* **171**, 198—199 (1971)
- Caspersson, T.O.: *Cell growth and cell function*. New York: Norton Co. 1950
- Craigie, E.H.: The vascularity of parts of cerebellum, brain stem, and spinal cord of inbred albino rats. *J. comp. Neurol.* **58**, 507—516 (1933)
- Diamond, M.C., Krech, D., Rosenzweig, M.R.: The effect of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *J. comp. Neurol.* **123**, 111—120 (1964)
- Eccles, J.C.: *The inhibitory pathways of the central nervous system*. Liverpool: Univ. Press 1969
- Eccles, J.C., Fatt, P., Koketsu, K.: Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *J. Physiol. (Lond.)* **126**, 524—562 (1954)
- Fischmeister, H.F.: Apparative Hilfsmittel in der Stereologie. In: Weibel, E.R., Elias, H.: *Quantitative methods in morphology*, p. 221—249. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967
- Frank, K., Fuortes, M.G.F.: Unitary activity of spinal interneurons of cats. *J. Physiol. (Lond.)* **131**, 424—435 (1956)
- Geinisman, Yu. Ya.: Nucleic acid content of spinal motoneurons and their satellites under orthodromic and antidromic stimulation. A cytophotometric study. *Brain Res.* **28**, 251—262 (1971)
- Geinisman, Yu. Ya., Larina, V.N., Mats, V.N.: Changes of neurone dimensions as a possible morphological correlate of their increased functional activity. *Brain Res.* **26**, 247—257 (1971)
- Henneman, E., Somjen, G., Carpenter, D.O.: Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *J. Neurophysiol.* **28**, 560—580 (1965)
- Hultborn, H., Jankowska, E., Lindström, S.: Recurrent inhibition from motor axon collaterals in interneurons monosynaptically activated from I a afferents. *Brain Res.* **9**, 367—369 (1968)
- Jankowska, E., Lindström, S.: Morphological identification of Renshaw cells. *Acta physiol. scand.* **81**, 428—430 (1971)
- Jankowska, E., Lindström, S.: Morphology of interneurons mediating I a reciprocal inhibition of motoneurons in the spinal cord of the cat. *J. Physiol. (Lond.)* **226**, 805—823 (1972)
- Kaizawa, J., Takahashi, I.: Motor cell columns in rat lumbar spinal cord. *Tohoku J. exp. Med.* **101**, 25—34 (1970)
- Kogan, A.B.: Inhibition of nerve cells and nerve centers. *Progr. Brain Res.* **22**, 55—66 (1968)
- Krantz, H.: Reaktion der Zellkerne auf Narkotika. *Z. Naturforsch.* **2b**, 428—433 (1947)
- Kulenkampff, H.: Der 24-Stunden-Mitoserhythmus im Spinalpendym der weißen Maus und seine experimentelle Beeinflussung. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **122**, 518—533 (1964)
- Lierse, W.: Die Kapillardichte im Wirbeltiergehirn. *Acta anat. (Basel)* **54**, 1—31 (1963)
- Matsushita, M.: Dendritic organization of the ventral spinal gray matter in the cat. *Acta anat. (Basel)* **76**, 263—288 (1970)
- Opitz, E., Schneider, M.: Über die Sauerstoffversorgung des Gehirns und den Mechanismus der Mangelwirkung. *Ergeb. Physiol.* **46**, 126—260 (1950)
- Palkovits, M., Fischer, J.: *Karyometric investigations*. Budapest: Akadémia Kiadó 1968
- Pannese, E., Bianchi, R., Calligaris, B., Ventura, R., Weibel, E.R.: Quantitative relationships between nerve and satellite cells in spinal ganglia. An electron microscopical study. I. Mammals. *Brain Res.* **46**, 215—234 (1972)

- Petrén, T., Sjöstrand, T., Sylvén, B.: Der Einfluß des Trainings auf die Häufigkeit der Kapillaren in Herz- und Skelettmuskulatur. *Arb. Physiol.* **9**, 367 (1937)
- Rather, L.J.: The significance of nuclear size in physiological and pathological processes. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **38**, 127—199 (1958)
- Renshaw, B.: Activity in the simplest spinal reflex pathways. *J. Neurophysiol.* **3**, 374—387 (1940)
- Rexed, B.: Some aspects of the cytoarchitectonics and synaptology of the spinal cord. *Progr. Brain Res.* **11**, 58—92 (1964)
- Romanes, G.J.: The motor pools of the spinal cord. *Progr. Brain Res.* **11**, 93—119 (1964)
- Ross, H.-G., Cleveland, S., Haase, J.: Quantitative relation of Renshaw cell discharge to monosynaptic reflex height. *Pflügers Arch.* **332**, 73—79 (1972)
- Ryall, R. W.: Renshaw cell mediated inhibition of Renshaw cells: patterns of excitation and inhibition from impulses in motor axon collaterals. *J. Neurophysiol.* **33**, 257—270 (1970)
- Ryall, R. W.: Excitatory convergence on Renshaw cells. *J. Physiol. (Lond.)* **226**, 69—70 P (1972)
- Ryall, R. W., Piercey, M. F.: Excitation and inhibition of Renshaw cells by impulses in peripheral afferent nerve fibers. *J. Neurophysiol.* **34**, 242—251 (1971)
- Ryall, R. W., Polosa, C., Piercey, M. F., Goldfarb, J.: Excitation of Renshaw cells in relation to orthodromic and antidromic excitation of motoneurons. *J. Neurophysiol.* **35**, 137—148 (1972)
- Wachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden. Berlin-Heidelberg-New York; Springer 1972
- Schadé, J. P.: On the volume and surface area of spinal neurons. *Progr. Brain Res.* **11**, 261—277 (1964)
- Scheibel, M. E., Scheibel, A. B.: Spinal motoneurons, interneurons and Renshaw cells. A Golgi study. *Arch. ital. Biol.* **104**, 328—353 (1966)
- Scheibel, M. E., Scheibel, A. B.: Terminal patterns in cat spinal cord. III. Primary afferent collaterals. *Brain Res.* **13**, 417—443 (1969)
- Smith, C. S., Guttman, L.: Measurement of internal boundaries in three-dimensional structures by random sectioning. *Trans. Amer. Inst. Mining Met. Engrs.* **197**, 81 (1953)
- Treff, W. M.: Größenbestimmung der Nervenzellen und Gliazellen im Caudatum mediale bei unterschiedlicher Schnittdicke im histologischen Präparat. *J. Hirnforsch.* **6**, 123—132 (1963)
- Wall, P. D.: Repetitive discharges of neurons. *J. Neurophysiol.* **30**, 1404—1423 (1967)
- Zimmermann, P.: Methodische Modifikationen und eine neue Technik zur Darstellung des neurosekretorischen Apparates und der Neuroglia bei Wirbellosen (*Lumbricus terrestris* L.). *Z. wiss. Mikr.* **68**, 154—162 (1967)

Dr. P. Zimmermann
Zentrum für Anatomie und
Cytobiologie
Justus Liebig-Universität
D-6300 Giessen
Friedrichstr. 24
Bundesrepublik Deutschland

Prof. Dr. F. W. Klußmann
Institut für normale und pathologische
Physiologie
der Universität
D-5000 Köln 41
Robert-Koch-Straße 39
Bundesrepublik Deutschland

7.2. Untersuchungen an Nervenzell-Glia-Komplexen und Kapillaren im
Oberschlundganglion von Lumbricus terrestris L.

7.2.1. Zusammenfassung der Beiträge:

a) ZIMMERMANN, P.: Beziehungen verschiedenartiger Zellkomplexe
des normalen und regenerierenden Nervensystems von Lumbricus terre-
stris L. zum Gefäßsystem.

Z. Zellforsch. 106, 423 - 438 (1970).

b) ZIMMERMANN, P.: Die intracytoplasmatische Organellenverteilung
als Indikator gerichteter Wechselbeziehungen zwischen Kapillarsystem
und zentralnervösen Zellkomplexen. Morphometrische Studien am Ober-
schlundganglion von Lumbricus terrestris L.

Z. Zellforsch. 110, 268 - 283 (1970).

c) ZIMMERMANN, P.: Die zentralnervöse Kontrolle der Dehydration
bei Lumbricus terrestris L.

Z. Zellforsch. 112, 551 - 571 (1971).

Die Nervenzell-Glia-Komplexe des Oberschlundganglions von Lumbricus terrestris liegen in der Ganglienzellschicht zwischen äußerem Neurilemm und zentralem Neuropil. Das enge Nebeneinander von peptidergen, aminergen und nicht sekretorischen Neuronen schafft besonders günstige Voraussetzungen für cytometrische Untersuchungen, da in diesen eng umschriebenen Arealen nahezu gleiche Bedingungen während der Gewebsaufbereitung herrschen.

Zur eindeutigen Charakterisierung der untersuchten Nervenzell-Glia-Komplexe wurde das Oberschlundganglion weiter unterteilt (Abb. 11; s. ZIMMERMANN, 1970 a). Areal I (A_I) reicht vom zirkulären Mediangefäß bis zu einem parallel verlaufenden lateralen Gefäß am Übergang in die zirkumoesophageale Kommissur. Hier überwiegen die "Gomori-positiven", peptidergen Neurone, die an der Ganglienzellschicht einen Volumenanteil von 21 % haben (Abb. 12). Im Areal II (A_{II}), das die Zellansammlungen am Abgang der Schlundkonnektive umfaßt, dominieren die "Gomori-negativen" Ganglienzellen mit einem Volumenanteil von 53 %. Ein Teil dieser "Gomori-negativen" Neurone gehört zu den monoaminhaltigen B-Zellen (TEICHMANN und AROS, 1966; RUDE, 1966; MYHRBERG, 1967). Areal III (A_{III}) repräsentiert ein kleines Gebiet des Oberschlundganglions, das dorso-medial dem Oesophagus anliegt. Gestreckte ependymähnliche Faserglia (Typ Ia, s. ZIMMERMANN, 1967) breitet sich dort in dichten Formationen zwischen Neurilemm und Neuropil aus, während Nervenzellen fehlen.

Diesen nach cytoarchitektonischen Gesichtspunkten abgegrenzten Arealen entsprechen Dichteunterschiede des cerebralen Kapillarplexus (Abb. 12): Während im Gebiet der "Gomori-positiven" Neurone und im Areal III etwa gleichhohe Werte der Kapillarlänge um 3000 mm/mm^3 vorkommen, sind im Areal II nur Werte um 1500 mm/mm^3 meßbar. Trägt man Kapillarlänge gegen den Volumenanteil von "Gomori-positiven" bzw. "- negativen" Ganglienzellen auf, so ergeben sich folgende Beziehungen (Abb. 13): Im Areal I

entfallen auf beide Neuronenklassen mehr Anteile des Kapillarkompartiments als im Areal II. Demgegenüber bestehen deutliche Unterschiede in der Kapillarbeziehung zwischen "Gomori-positiven" und "-negativen" Neuronen des Areals II. Erstere zeichnen sich durch ein günstigeres Verhältnis von Volumenanteil zu Kapillarlänge aus, während letztere weniger Kontaktmöglichkeiten mit Kapillaren besitzen. Auf die starke Kapillarisation von Hirngebieten, in denen sekretorisch aktive Neurone dominieren, hat bereits CRAIGIE (1940) hingewiesen. Seine Messungen am Nucleus paraventricularis bzw. Nucleus supraopticus der Ratte ergaben Kapillarlängen-Werte von 2023 mm/mm^3 bzw. 1960 mm/mm^3 . Diese hohe Kapillardichte im Gebiet peptiderg-sekretorischer Neurone weist auf eine doppelte Funktion des Gefäßsystems hin; es transportiert hier neben Sauerstoff, Glucose und Metaboliten für die Proteinsynthese auch Neurohormone, die von den Ganglienzellen im Bereich von Kapillarschlingen abgegeben werden (HERLANT-MEEWIS, 1956-57; TAKEUCHI, 1965; 1968).

Die Kapillarschlingen liegen mit ihren Scheiteln in der Neurosekret-Depotzone an der Grenze zwischen Ganglienzellschicht und Neuropil; sie münden in das cerebrale Kapillarnetz und sind von der Aufzweigung bis zur Schlingenkuppe etwa $30 \mu\text{m}$ lang (Abb. 14 b: L_3 -Schlingen, s. ZIMMERMANN, 1971). Längere Schlingen (L_2) begleiten Axonbündel, die von komplexartig zusammengeschlossenen neurosekretfreien Ganglienzellen abgehen (Abb. 14c). Die in das Neuropil einstrahlenden Axone liegen entweder zwischen beiden Schlingenschenkeln oder nehmen von außen her Kontakt mit diesen auf. Der Abstand zwischen Ursprungskegel und Kreuzung der Axone mit der Kapillarschlinge variiert zwischen 50 und $70 \mu\text{m}$. Neben diesen beiden Schlingentypen fallen die schon von E. SCHARRER (1940) beobachteten "hairpin-like loops" auf. Ihre beiden Gefäßschenkel durchdringen getrennt das Neurilemm und bilden eine Schleife (L_1). Diese Form des Gefäßverlaufs findet man im Oberschlundganglion vor allem im schlundnahen Bereich der

hinteren Zirkumferenz (Abb. 15). Die L_1 -Schlingen besitzen eine interkapilläre Kontaktfläche, d.h. die beiden Kapillarschenkel sind nur durch eine Cytoplasmaschicht der Perikapillarzellen voneinander getrennt (Abb. 16 a, b). Sie entsprechen dadurch den von LIERSE (1964) charakterisierten "loopings", die nach dem Gegenstromprinzip zur O_2 -Konzentration fähig sein sollen.

Die speziellen Beziehungen zwischen Kapillaren und Nervenzell-Glia-Komplexen werden durch Akkumulation von stoffwechselaktiven Zellorganellen im Kontaktbereich hervorgehoben. So fallen z.B. an der Kreuzung von Kapillarschlingen mit Axonen intraaxonale Mitochondrienansammlungen auf (Abb. 16 c). Die Mitochondrien der neurosekretorischen Ganglienzelle in Abb. 17 sind gehäuft auf der gefäßnahen Seite des Perikaryons zu sehen. Die unterschiedliche Verteilung von Mitochondrien und Zisternen des endoplasmatischen Reticulums in Perikapillar-, Glia- und Ganglienzellen läßt sich an elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Kapillarquerschnitten cytometrisch bestimmen. Hierfür wird das gefäßabhängige Areal in drei Zonen unterteilt (Abb. 18), in denen der direkte Kontakt zwischen Perikapillar- und Gliazellen (Zone I) oder zwischen Glia- und Ganglienzellen (Zone II und III) überwiegt. Außerdem wird das perikapilläre Meßfeld durch ein Quadratnetz in vier Quadranten aufgeteilt, wobei der Schnittpunkt der Hauptkoordinaten im Mittelpunkt des Kapillarquerschnitts liegt. Die Hauptachse ist so ausgerichtet, daß sie durch die Ganglienzellschicht vom Neu- rilemm zum inneren Neuropil verläuft. Diese Achsenrichtung wurde gewählt, um auch die Verteilung von Mitochondrien und Zisternen des ER im Austauschweg vom Coelom zur Ganglienzellschicht zu berücksichtigen. Abb. 19 zeigt eine neuropilwärts gerichtete (Pfeil) Mitochondrienansammlung im Cytoplasma der Perikapillarzellen. Außerdem kann man strukturelle Besonderheiten der Hirnkapillaren von Lumbricus terrestris erkennen: Es fehlen hier Endothelzellen. Die Erythrocytenpartikel werden durch eine deutliche Basallamina von den Perikapillarzellen (wie sie sinngemäß, im

Gegensatz zu HAMA, 1960 , bezeichnet werden sollten) getrennt. Zonae adhaerentes verbinden die Perikapillarzellen untereinander; Hemidesmosomen verankern diese Zellen an der Basallamina.

Eine cytometrische Studie zur Verteilung von Mitochondrien und Zisternen des ER der Perikapillar- Glia- Ganglienzellkomplexe im Areal I des Oberschlundganglions erbrachte folgende Ergebnisse (Abb. 20): In der Kontaktzone zwischen Perikapillar- und Gliazellen (Zone I) liegen die Häufigkeitsmaxima der Verteilung von Mitochondrien und Zisternen des ER der Perikapillarzellen in der Neurilemm-Neuropil-Achse. Hierzu gleichsinnig verteilt sind die Formationen des ER der Glia- und Ganglienzellen. Die meisten Mitochondrien beobachtet man hingegen im Quadranten 2 von Glia- und Ganglienzellen, d.h. die Mitochondrienverteilung in der perineuronalen Glia stimmt nicht mit der in Perikapillarzellen überein, sondern entspricht der Mitochondrienverteilung der Ganglienzellen. Als weiterer Hinweis auf eine engere funktionelle Kopplung zwischen Glia- und Ganglienzellen kann die gleichsinnige Häufigkeitsverteilung von Mitochondrien und Zisternen des ER in Glia- und Ganglienzellen der kapillarfernen Zone II und III gedeutet werden.

Die cytometrischen Befunde zeigen, daß stoffwechselaktive Zellorganellen in Richtung auf Kontaktzonen zwischen funktionell gekoppelten Zellelementen orientiert sind. Dieses Prinzip dient der Minimalisierung von Austauschwegen zwischen voneinander abhängigen Zellsystemen.

Nach der Klärung des Aufbaus von Nervenzell-Glia-Komplexen und ihrer Beziehungen zum Gefäßsystem des Oberschlundganglions von Lumbricus terrestris wurde mit gleicher cytometrischer Technik die Cytodynamik dieser Zellkomplexe unter Dauerstimulation verfolgt. Zur Aktivierung der peptiderg-sekretorischen Neurone in der Area I wurde das Dehydrations-Experiment gewählt, da KAMEMOTO (1964) beim Regenwurm die Beeinflussbarkeit des Elektrolyt- und Wasserhaushalts durch einen neurohormonalen Faktor aus dem Oberschlundganglion nachgewiesen hat. Während

des zweistündigen Versuchs befanden sich die Tiere in Glasgefäßen, die mit trockenem Zellstoff ausgelegt waren, der nach jeder Gewichtskontrolle gewechselt wurde. Durch Wägung 30, 60 und 120 min. nach Versuchsbeginn wurde der Flüssigkeitsverlust kontrolliert. Ein Vergleich der Gewichtsverlustkurven mit quantitativ-morphologischen Veränderungen im Oberschlundganglion läßt sich durch Bestimmung des Volumenanteils "Gomori-positiven" Ganglienzellen und der Größe des cerebralen Kapillarkompartiments (Kapillarlängenmessung) in entsprechenden Zeitintervallen erreichen. Während der ersten 30 min. beobachtet man eine Abnahme des "Gomori-positiven" Volumenanteils und der Kapillarlänge im Areal I (Abb. 21a); dies verläuft parallel zum initialen rapiden Körpergewichtsverlust. Auf die Adaptionsphase folgt im 30 - 60 min-Intervall nur noch ein mäßiger Abfall des "Gomori-positiven" Sekretgehalts und der Kapillarlänge. Offensichtlich wird eine neuroendokrin gesteuerte Gegenregulation wirksam, und die Aktivierungsprozesse für die Neusynthese von Peptidhormonen in den "Gomori-positiven" Neuronen laufen an (Letzteres geht aus der Zunahme von Protein- und Nucleinsäure-Konzentration in den peptidergen Neuronen hervor, s. ZIMMERMANN, 1973; Abb. 6). Die gesteigerte Hormonsynthese wird 60 - 120 min. nach Versuchsbeginn an der Vergrößerung des Volumenanteils der "Gomori-positiven" Perikaryen und des Kapillarkompartiments erkennbar (Abb. 21 b).

Um die verschiedenen Aktivitätsphasen der "Gomori-positiven", peptidergen Neurone und die hiermit funktionell gekoppelten Änderungen des cerebralen Kapillarnetzes besser deuten zu können, wurden die Reaktionen der vermuteten peripheren Zielorgane der Neurohormone - Nephridien, Darm, Integument - in gleichen Zeitintervallen im Dehydrations-Versuch cytomorphologisch untersucht.

Abb. 11. Rekonstruktion des Gefäßsystems einer Hälfte (Hemisphäre) des Oberschlundganglions von Lumbricus terrestris aus Serienschnitten. (.....) Grenze zwischen zentralem Neuropil und Ganglienzellschicht. A_I Areal mit überwiegend "Gomori-positiven" Neuronen und Kapillarschlingen. A_{II} Ganglienzellschicht mit vorwiegend "Gomori-negativen" Neuronen und Kapillarnetzen. A_{III} Gebiet der ependym-ähnlichen Faserglia.



125 μm

Abb. 12. Größe des Kapillar- und Ganglienzellanteils im Ober-
schlundganglion von Lumbricus terrestris. Kapillarlänge (L_{VC}) ist
in den Arealen I und III etwa doppelt so hoch wie in Areal II.
Die Volumenanteile (V_V) von "Gomori-positiven" (NG) und "-nega-
tiven" Neuronen (BG) sind im Areal I etwa gleichgroß, im Areal II
überwiegen die "Gomori-negativen" Ganglienzellen.

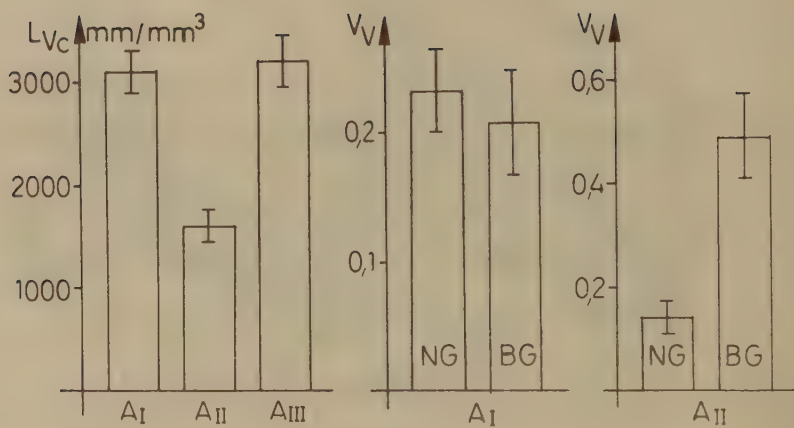


Abb. 13. Beziehung zwischen Kapillarlänge (L_{Vc}) und Volumenanteil (V_v) von "Gomori-positiven" (●) bzw. "-negativen" (○) Neuronen im Areal I sowie Areal II des Oberschlundganglions von Lumbricus terrestris. Abszisse: Volumenanteil in %. Ordinate: Kapillarlänge in mm/mm^3 .

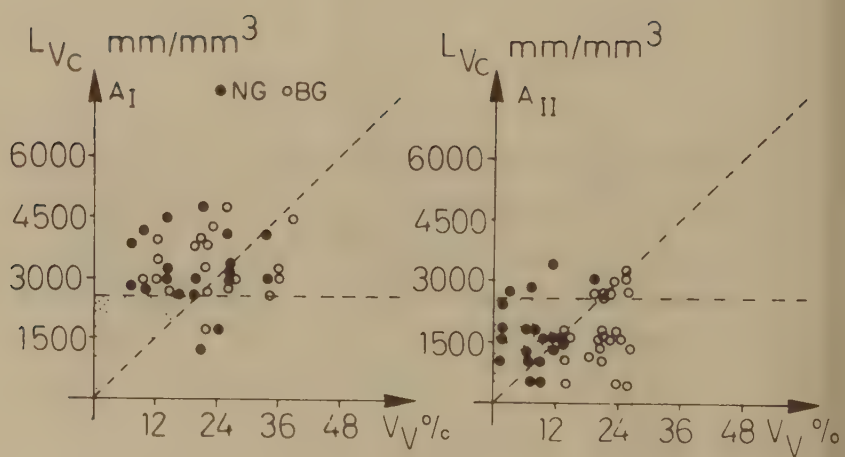


Abb. 14. Areal I des Oberschlundganglions von Lumbricus terrestris. Bouin. Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Vergr. 450fach. C Durchtritt einer Kapillare durch das Neurilemm (NI) N Neuropil. a) Kapillarnetz. b) L_3 -Kapillarschlinge rechts im Bild. c) L_2 -Kapillarschlinge.

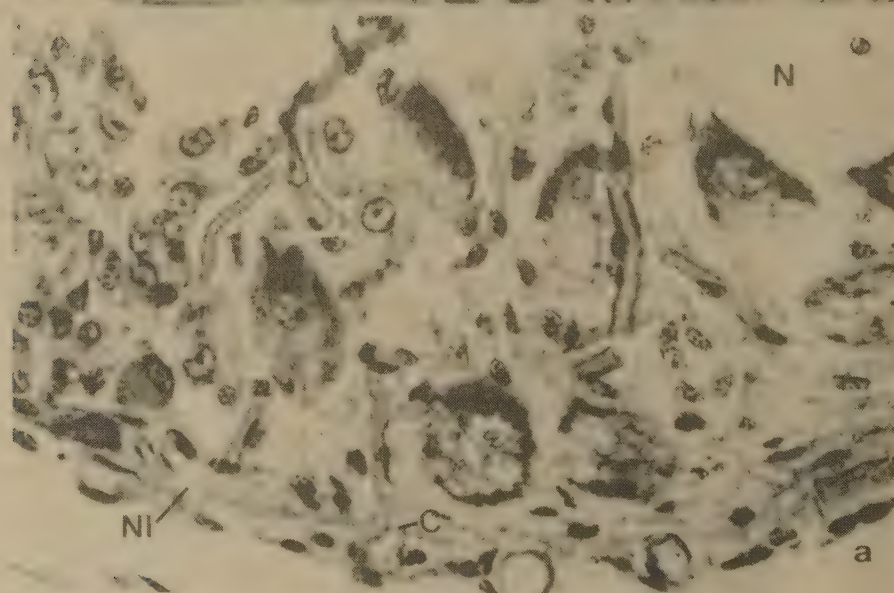
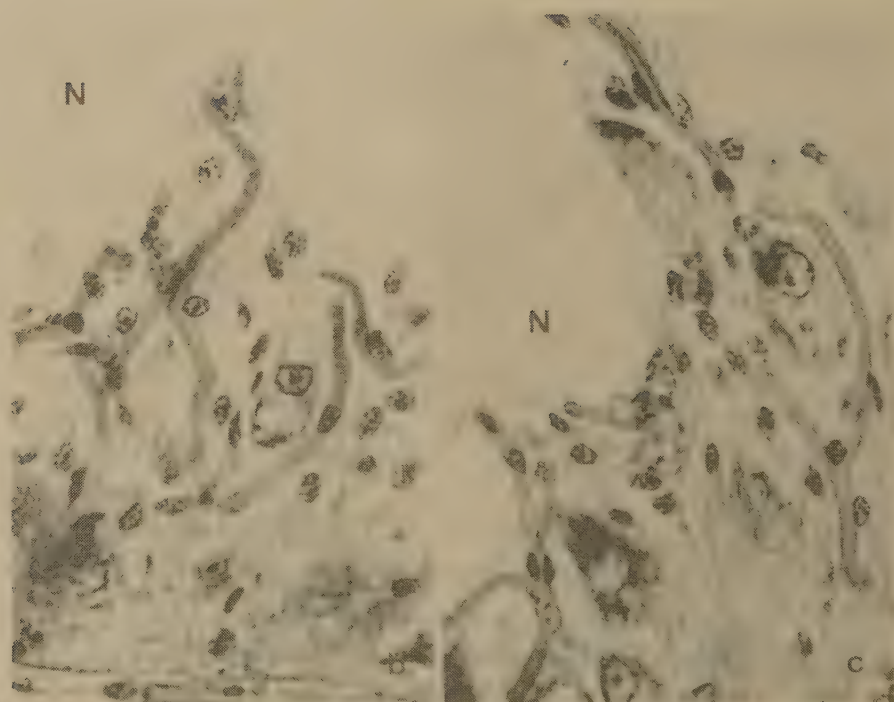


Abb. 15. Areal III des Oberschlundganglions von Lumbricus terrestris.
Bouin. Orange G-Fluoreszenz (s. ZIMMERMANN, 1967). Vergr. 450-
fach. Fluoreszierende tanyzytenähnliche Faserglia zwischen Neurilemm
(Ni) und Neuropil (N). OrangeG-markiertes Erythrocyruorin fluoresziert
in der L_1 -Schlinge (L_1) des Kapillarplexus.

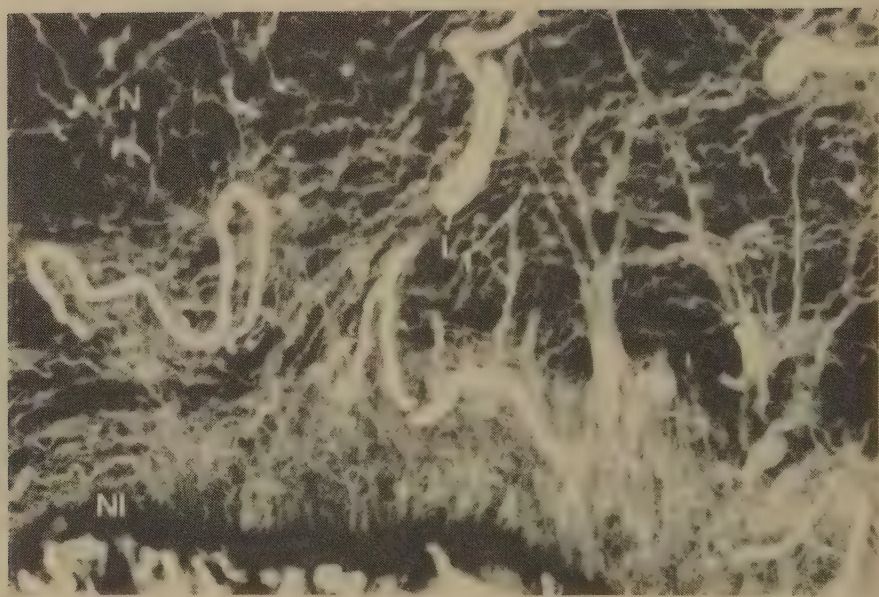


Abb. 16. a,b) L_1 -Kapillaren. Eine Zytoplasmalamelle der Perikapillazelle (P) trennt die beiden Kapillarschenkel. a) Vergr. 12000fach. b) Vergr. 19000fach. c) Anschnitt des Scheitels einer L_3 -Kapillarschlinge (C). Im angrenzenden Axonlängsschnitt fällt eine starke Mitochondrienakkumulation auf. ER Zisternen des endoplasmatischen Reticulums. NP Neuropil. Vergr. 18400fach.

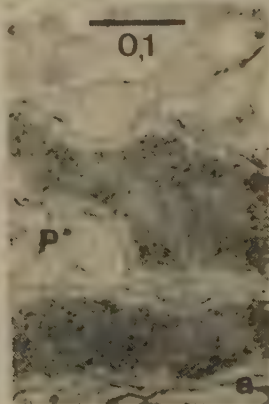
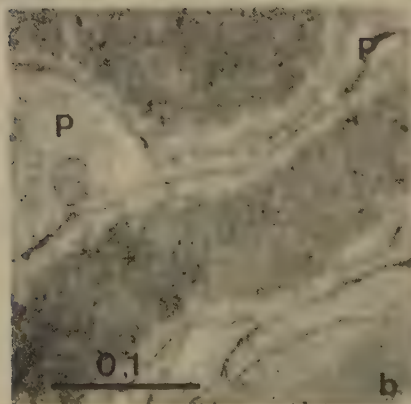
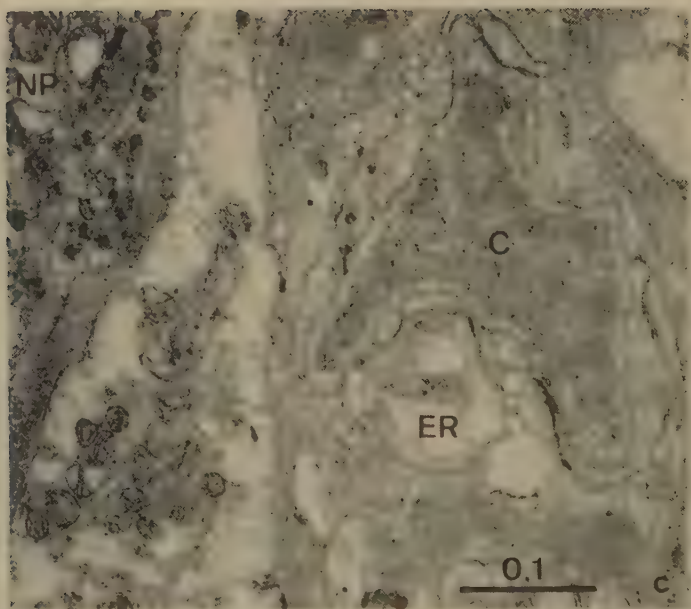


Abb. 17. L_2 -Kapillarschlinge (C), von einer neurosekretorischen Ganglienzelle (NG) durch Gliafortsätze getrennt. Mitochondrien und erweiterte Zisternen des ER sind zum Gefäß hin orientiert. Vergr. 18400fach.

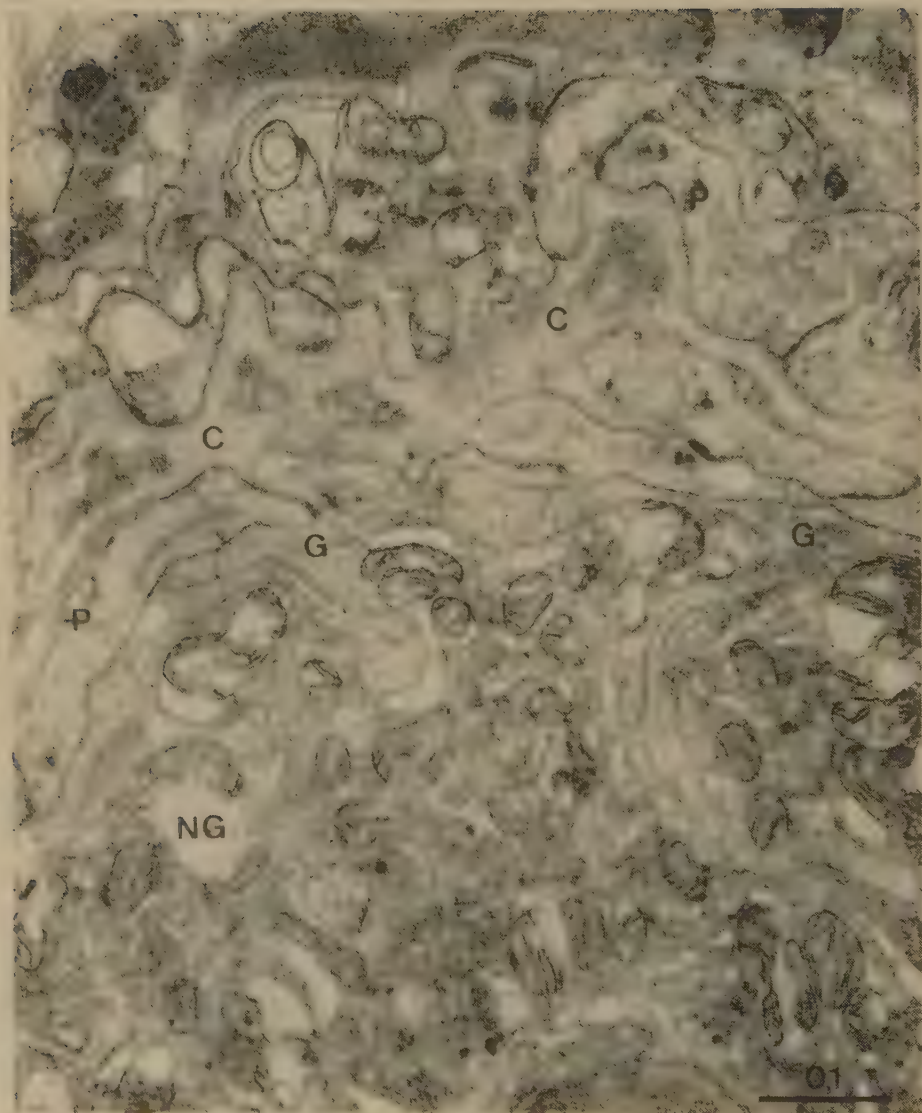


Abb. 18. Oberschlundganglion. Lumbricus terrestris. Kapillarquerschnitt mit angrenzenden Gliastrukturen liegt im Zentrum des darüberprojizierten Quadratnetzes (Abstand der groben Netzunterteilung 1,5 cm). Vier Quadranten (1 - 4) und drei Kreiszonen (I - III) dienen der Auszählung räumlich unterschiedlich verteilter Objekte. Der Pfeil markiert die Neurilemm-Neuropil-Achse und zeigt in Richtung auf das Neuropil. Die Gesamttestpunktzahl der Zone I beträgt 314, die der Zone II 394 und die der Zone III 550.

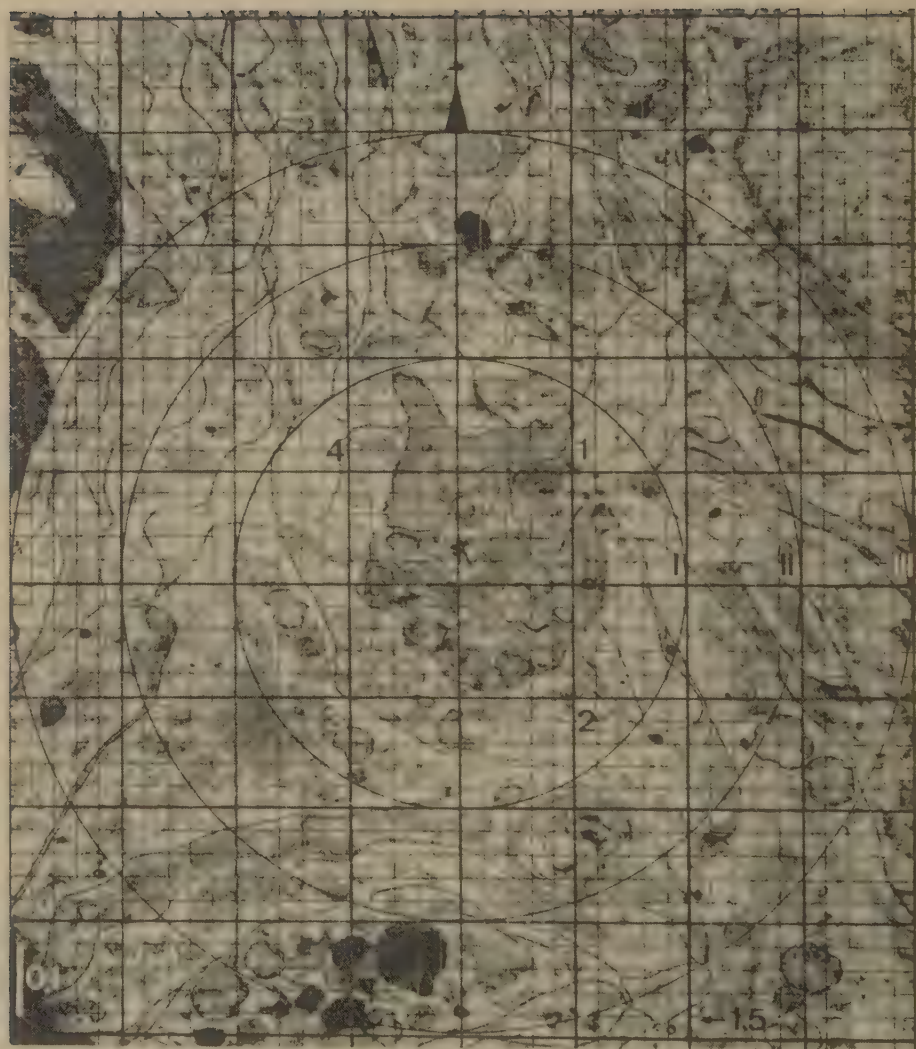


Abb. 19. Kapillarquerschnitt aus dem Areal III. des Oberschlundganglions von Lumbricus terrestris. Der Pfeil zeigt in Richtung auf das Neuropil. B. Basallamina. ER endoplasmatisches Reticulum der Gliazellen. M neuropilwärts gerichtete Mitochondrienansammlung im Cytoplasma der Perikapillarzellen (P). N I Neurilemmmaterial mit Hemidesmosomen in den angrenzenden Gliazellfortsätzen. Vergr. 9200fach.

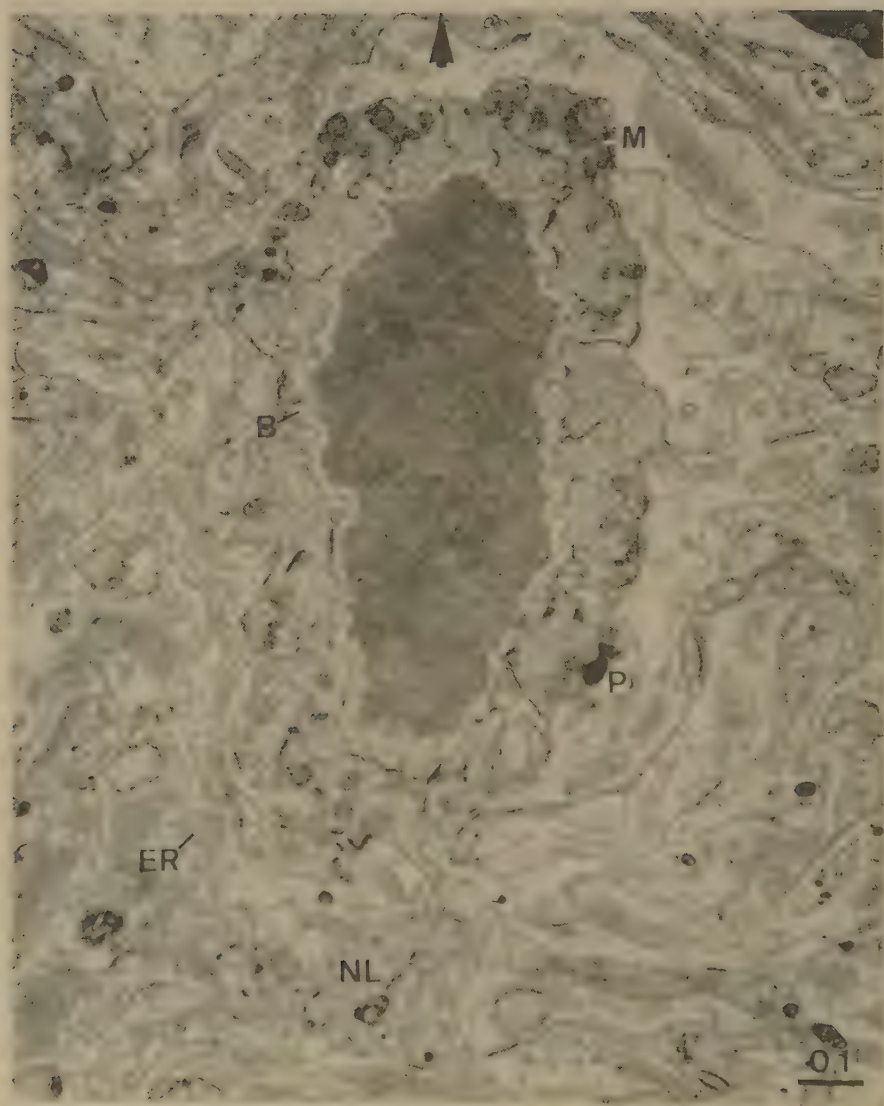


Abb. 20. Mitochondrienanteil (V_{mi}) und Anteil der Zisternen des endoplasmatischen Reticulums (V_{er}) am Cytoplasma von Perikapillarzellen (—→), Gliazellen (----) und Neuronen (-.-.-.) in den vier Quadranten (1 - 4) der kapillarnahen (Z_{I}) und der kapillarfernen Zonen (Z_{II} , Z_{III}). Anteile sind als Volumendichten angegeben.

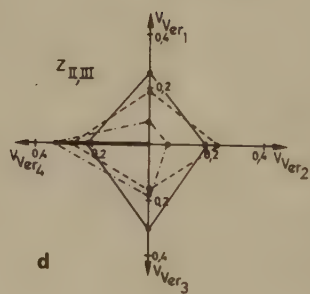
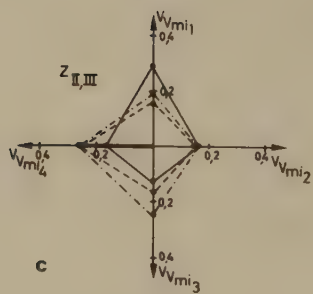
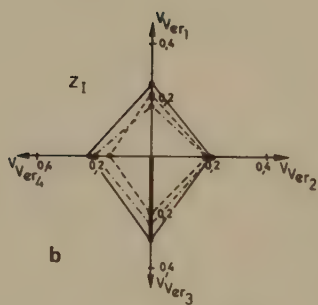
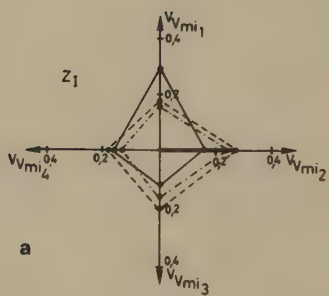
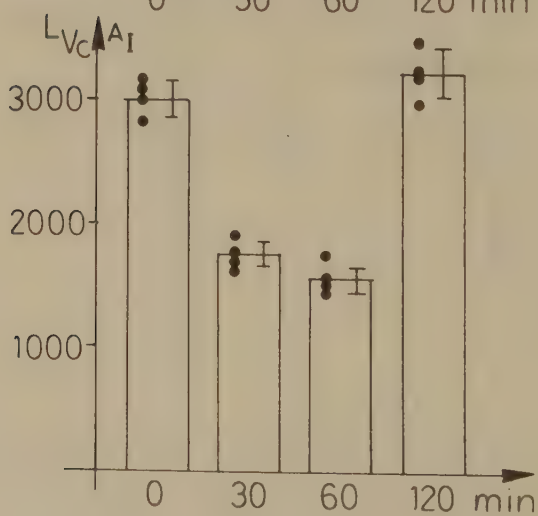
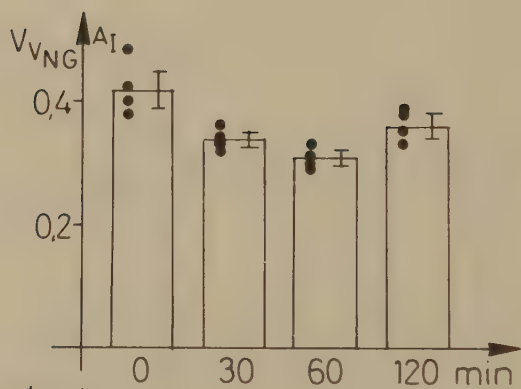


Abb. 21. Änderung des "Gomori-positiven" Volumenanteils
(V_{VNG} , Volumendichte) und der Kapillarlänge (L_{VC} , mm/mm³)
im Areal I (A_I) des Oberschlundganglions von Lumbricus terrestris
im Verlauf einer zweistündigen Dehydration.



7.2.2. Zur neuronalen Regulation des Wasserhaushalts bei

Lumbricus terrestris L.

7.3. Kälteinduzierte Ödem- und Nekroseentwicklung im
Parietalcortex von Kaninchen .

Zur neuronalen Regulation des Wasserhaushalts bei *Lumbricus terrestris* L.

P. Zimmermann *

Zentrum für Anatomie und Cytobiologie, Justus Liebig-Universität, Gießen **

Eingegangen am 23. Juni 1973

Neuronal Regulatory Mechanisms of the Water Balance in *Lumbricus terrestris* L.

Summary. Earthworms tolerate loss of fluids up to 70% of their total body weight. The adaptive capacity must thus be very high in organs which control the exchange of water and electrolytes in nephridia, the intestine and skin. In order to study the influence of the central nervous system on adaption, the supra- and suboesophageal ganglion and the 10th–15th segments behind the clitellum were removed. In segments deprived of ventral nerve cord the mucous content of epidermal cells, the nuclear area of intestinal epithelial cells and chloragogen cells together with the circumference of nephridial tubules were measured 30, 60 and 120 min after placing *Lumbricus terrestris* in a standardized dry environment. Protein and nucleic acid contents of Gomori-positive neurons in the supraoesophageal ganglion were measured at these times. Comparison of the results of cytometric and microspectrographic measurements shows that 1) the distal segment of the wide nephridial tube is under neuroendocrine control, 2) intestinal epithelial cells and chloragogen cells are influenced by segmental neurons and central secretory nervous elements, 3) mucous secretion is autonomous but may be controlled by segmental nerve impulses. Therefore, water- and electrolyte exchange in *Lumbricus terrestris* is regulated by secretory peptidergic neurons of the supraoesophageal ganglion and by nerve cell complexes in the ventral nerve cord.

Key words: Water balance — *Lumbricus terrestris* L. — Neuroendocrine mechanisms — Cytometry — Microspectrography.

Zusammenfassung. Im Dehydrations-Experiment tolerieren Regenwürmer Flüssigkeitsverluste bis zu 70% ihres Körpergewichts. Hierbei ergeben sich hohe Anforderungen an die Anpassungsfähigkeit von Nephridien, Darm und Integument, die im Dienste des Wasser- und Elektrolythaushalts stehen. Um die Abhängigkeit dieser Organe von zentralnervösen Einflüssen zu studieren, wurden bei *Lumbricus terrestris* Ober-, Unterschlundganglion sowie ein Bauchmarkabschnitt zwischen dem 10.–15. Segment hinter dem Clitellum entfernt. In diesen Segmenten wurden 30, 60 und 120 min nach Versuchsbeginn der Schleimgehalt von Epidermiszellen, die Kerngröße von Darmepithel- und Chloragogen-Zellen sowie der innere und äußere Tubulusumfang von Nephridien cytometrisch bestimmt. In gleichen Intervallen wurde im Oberschlundganglion der Nucleinsäure- und Proteingehalt „Gomori-positiver“ Neurone mikrospektrographisch gemessen. Aus dem Vergleich von cytometrischen und mikrospektrographischen Daten geht hervor: 1. Der nephridiale Stäbchenkanal steht am stärksten unter neuroendokrinem Einfluß. 2. Darmepithel- und Chloragogen-Zellen hängen sowohl von zentraler, neuroendokriner als auch von segmentaler, nervöser Kontrolle ab. 3. Die Schleimsekretion von Epidermiszellen wird wahrscheinlich über segmentale Nerven gesteuert; sie zeigt jedoch die ausgeprägteste Autonomie. Somit stehen die an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts beteiligten Organe von *Lumbricus terrestris* unter einer doppelten Kontrolle durch peptiderge sekretorische Neurone des Oberschlundganglions und segmentale Neurone des Bauchmarks.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

** Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Oksche.

Einleitung

Die Regulation des Wasserhaushalts spielt eine zentrale Rolle für die Homöostase des Regenwurmorganismus. Wasserverluste können in weiten Bereichen toleriert werden; für *Lumbricus terrestris* liegt die Letalitätsgrenze erst bei einem Wasserverlust in der Größenordnung von 70% des Körpergewichts (Normaler Wassergehalt: $84,8 \pm 1,597\%$ des Körpergewichts; s. Roots, 1955). Diese hohe Sicherheitsspanne läßt auf eine große Anpassungsfähigkeit der Organe schließen, die für einen konstanten osmotischen und hydrostatischen Druck sorgen. Beim Regenwurm erfolgt die Wasseraufnahme durch das Integument (Jackson, 1926; Wolf, 1938; Roots, 1956) und den Darm (Maluf, 1936; Bahl, 1947), während als Exkretionsorgane Nephridien (Ramsay, 1949; Boroffka, 1965) und in geringem Umfang auch der Darm (Dietz und Alvarado, 1970) gelten. Im Aufbau von Integument, Darm und Nephridien zeigt sich das segmentale Bauprinzip des Regenwurmkörpers. Seine Untergliederung in metamere Funktionseinheiten gilt als Hinweis auf deren autonome, von übergeordneten Zentren unabhängige Regulationsfähigkeit. Jedoch schon Maluf (1939) beobachtete bei *Lumbricus terrestris* nach Durchtrennung des Bauchmarks und Eintauchen der Tiere in Wasser eine überdurchschnittliche Zunahme des Körpergewichts, die der Autor auf eine Beeinflussung der Hautpermeabilität durch das Oberschlundganglion bezog. Später beschrieben Aros und Bodnar (1960) sowie Otremba (1961) eine Aktivitätssteigerung „Gomori-positiver“ neurosekretorischer Zellen im Oberschlundganglion von Regenwürmern, die in einem trockenen Milieu gehalten wurden. (Nach einer neueren Nomenklatur gehören diese sekretorischen Neurone zum peptidergen Typ). Der Nachweis eines übergeordneten Regulationszentrums für den Wasser- und Elektrolythaushalt von *Lumbricus terrestris* gelang Kamemoto (1964) durch Messung des osmotischen Druckes und Natriumgehaltes in Blut und Coelomflüssigkeit nach Exstirpation des Ober- und Unterschlundganglions. Nur die Tiere, denen das Oberschlundganglion entfernt worden war, zeigten nach Immersion in Wasser eine Körpergewichtszunahme und eine Abnahme der Natriumkonzentration in den untersuchten Körperflüssigkeiten; diese Fehlregulation konnte durch Injektion des entnommenen Nervengewebes kompensiert werden. Eigene Experimente zur genaueren Lokalisation des übergeordneten Nervenzentrums für kontrollierten Wasseraustausch führten zu der Feststellung, daß funktionell gekoppelte aminerge und peptiderge Neuronenkomplexe in Ober- und Unterschlundganglion die wichtigsten Schaltelemente darstellen (Zimmermann, 1971).

In einer weiteren Studie sollte geklärt werden, in welchem Umfang zentralnervöse und lokale, nichtnervöse Mechanismen den Regulationsablauf der Austauschorgane — Integument, Darm, Nephridien — bei permanentem Flüssigkeitsverlust beeinflussen. Nach Entfernung von Ober- und Unterschlundganglion sowie von einigen Bauchmarksegmenten wurden mit cytometrischen Methoden die zeitabhängigen Reaktionen 1. des Integument am Ausmaß der Schleimbildung, 2. der Nephridien durch Bestimmung der Tubulusweite und -epithelhöhe sowie 3. des Darmes an der Zellkernfläche der Darmepithelzellen und der Chloragogenzellen im Bereich der Typhlosole verfolgt. Um den zentralnervösen Einfluß auf einzelne Regulationsphasen nachzuweisen, habe ich in den peptidergen Neuronen des Oberschlundganglions mikrospektrographisch Nucleinsäure- und Protein-

gehalt von Kern und Cytoplasma bestimmt und mit den Meßwertänderungen der oben aufgezählten cytologischen Parameter korreliert.

Material und Methodik¹

Untersuchungen über Homöostase-Mechanismen von Lumbriciden müssen die starke Abhängigkeit der Meßwerte von jahres- und tageszeitlichen Rhythmen berücksichtigen (Bennet und Willis, 1966). Um diesen Anforderungen zu genügen, wurden nur geschlechtsreife Tiere (*Lumbricus terrestris* L.) mit einem Körpergewicht von 5–8 g, die im Mai im gleichen Biotop gefangen worden waren, in eigenen Versuchen verwendet. Sie wurden bis zum Beginn des Dehydrations-Experiments für 14 Tage unter Standardbedingungen gehalten (s. Zimmermann, 1971).

Einen Tag vor Versuchsbeginn entfernte ich bei 20 Regenwürmern das Ober- und Unterschlundganglion sowie ein Stück Bauchmark vom 10. bis 15. Segment hinter dem Clitellum. Unter dem Operationsmikroskop (Zeiss) war darauf zu achten, daß bei der Exstirpation des Bauchmarks die Coelomhöhle streng in der Medianebene eröffnet und die Segmentalnerven mit einer feinen Iridektomieschere direkt am Austritt aus dem Bauchmark durchtrennt wurden, um eine Verletzung des Darmrohres und der benachbarten Nephridien zu verhindern.

Das Dehydrations-Experiment (Versuchsanordnung s. Zimmermann, 1971) begann um 8.00; nach 30, 60, 120 min wurden je 5 Tiere der Kontrollgruppe (Scheinoperation mit Eröffnung der Coelomhöhle in den Segmenten 3. und 4. sowie in den Segmenten 10. bis 15. hinter dem Clitellum) und des operierten Kollektivs in Bouinscher Lösung für 24 Std fixiert. Anschließend wurden die bauchmarklosen Segmente sowie die entsprechenden Segmente der Kontrolltiere unter Standardbedingungen in Paraplast eingebettet, in 10 µm dicke Serienschnitte zerlegt und mit einer modifizierten, standardisierten Trichrommethode (Zimmermann, 1967) gefärbt.

Cytometrie

Epidermis. Die schleimbildenden Zellen der Epidermis lassen sich nach Kombinationsfärbung mit Alcianblau-Orange G (s.o.) aufgrund ihres blaugrün granulierten Cytoplasmas gut von den granulafreien Stützzenen unterscheiden (vgl. Abb. 1a). Die Volumendichte (V_{Vi}) dieser beiden Zelltypen wurde mit dem Punktzählverfahren im dorsalen Abschnitt zwischen den beiden dorsalen Chaetae bestimmt (Meßfeldgröße: 900 µm²; Testpunkte pro Meßfeld: 36):

$$V_{Vi} = \frac{P_i}{P_T} \quad (\text{vgl. Weibel und Elias, 1967}).$$

Da die Anordnung der Epidermiszellen im Segmentquerschnitt einer gerichteten Struktur entspricht, wurden pro Meßfeld zwei Messungen mit einem Winkel von 19° und 71° zur Vorzugsrichtung ausgeführt (vgl. Sitte, 1967). Anzahl der Messungen pro Tier (n) = 100.

Darm. Die Kernfläche von Chloragogen- und Darmepithelzellen wurden im Bereich der Typhlosole (Abb. 1b, c) durch Auszählen der Punkte (P_A) bestimmt, die auf die Anschnittflächen eines Kerns entfallen (Rasterpunktabstand (d): 0,75 µm):

$$A_N = P_A \cdot d^2 (\mu\text{m}^2)$$

Anzahl der Messungen pro Tier (n) = 100.

Nephridien. Zilienkanal, Ampulle, Bläschenkanal und Stäbchenkanal sind nach den Untersuchungen von Ramsay (1949) und Boroffka (1965) die aktiven Abschnitte des nephridialen Tubulussystems, da dort gegenüber Blut und Coelomflüssigkeit hypotone Urinkonzentrationen gefunden werden. Cytologisch lassen sich besonders gut der Cilienkanal (intracytoplasmatische Pigmentgranula) und der Stäbchenkanal (basale Streifung) differenzieren (Abb. 1d) (vgl. Cordier, 1934; Graszynski, 1963). Aus diesem Grund wurden der innere und der äußere Umfang von Querschnitten des Cilien- und Stäbchenkanals durch Auszählen der Schnitt-

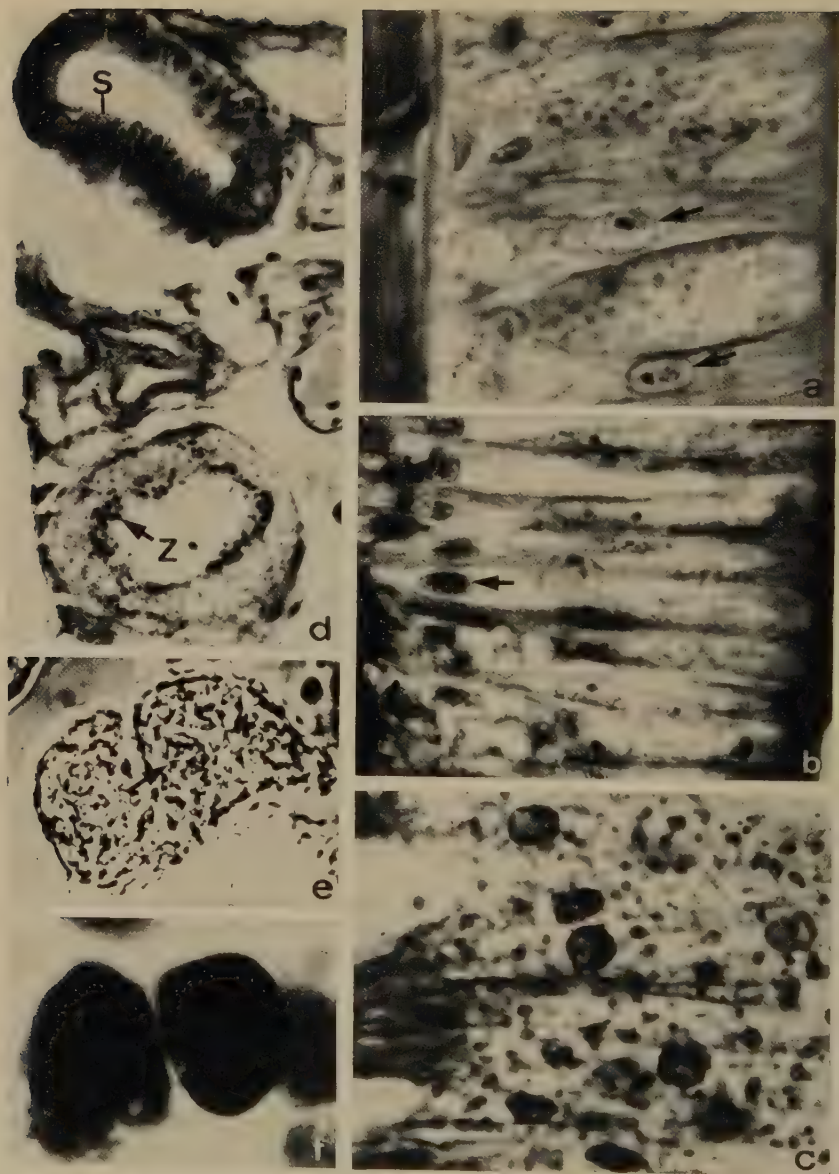


Abb. 1a—f. *Lumbricus terrestris* L. a) Epidermis. Granulagefüllte, Schleim sezernierende Epidermiszellen neben Stützzellen. $\uparrow$ Zellkern einer Stützzelle. Vergr. 1000 $\times$. b) Darmepithel im Bereich der Typhlosole. Basal gelegene Zellkerne ($\uparrow$). Vergr. 1000 $\times$. c) Granulare Chloragogenzellen im Bereich der Typhlosole. Vergr. 1000 $\times$. d) Frontaler Querschnitt durch die 2. Schlinge eines Nephridiums mit Zilienkanal (Z) und Stäbchenkanal (S). $\uparrow$ Granula des Zilienkanals. | Streifung des Stäbchenkanals. Vergr. 400 $\times$. e) Einzelzellpräparation des kleinsten Neuronentyps im Oberschlundganglion von *Lumbricus terrestris* zur mikrospektrophotometrischen Bestimmung des Protein- und Nucleinsäuregehaltes. Eindeckmedium: wasserfreies Glycerin (Merck). $\uparrow$ Zellkern. f) Präparat wie in Abb. 1e, in Bouin nachfixiert, mit Kaliumpermanganat voroxydiert und anschließend mit Paraldehydfuchsin gefärbt. Beachte (im Vergleich zu e) die Übereinstimmung der Zellgröße

punkte der apikalen und basalen Zellmembranen der Tubuluszellen mit den Testlinien eines Quadratnetzes (Testlinienabstand: 10 μm) bestimmt:

$$B = \frac{\pi}{4} \cdot I \cdot d$$

Um den Informationsgehalt der Meßwerte zu steigern, wurde der Quotient aus innerem und äußerem Tubulusumfang gebildet. Dadurch konnten sowohl Änderungen der Tubulusweite als auch der Epithelhöhe mit Hilfe eines Zahlenwertes ausgedrückt werden.

Anzahl der Messungen pro Tier (n) = 50.

Mikrospektrographie²

Nach Freipräparieren des Oberschlundganglions wurde die weißlich schimmernde, dorsal gelegene Ganglienzellschicht mit einer feinen Iridektomieschere abgetrennt und auf einen Quarzobjektträger (Herasil I) in einen Tropfen wasserfreies Glycerin (Merck) übertragen. Mit Hilfe von Glasmikroelektroden wurde die Ganglienzellschicht vorsichtig zerzupft und abschließend mit einem Quarzdeckglas (Herasil I) eingedeckt. Die Messungen erfolgten im Doppelstrahlverfahren mit dem Mikrospektrophotometer MS 1206 (Beckman, München); Xenonlampe XB O 450 (Osram), Bandbreite 5 nm (Gittermonochromator), Meßfeldblende 1 μm . Projektiv: Ultrafluor (Zeiss) 100/1,3. Objektiv: Ultrafluor Ph (Zeiss) 100/0,05. Um Relativwerte für die intraneuronale Protein- bzw. Nucleinsäurekonzentration zu erhalten, wurde bei 280 nm bzw. 260 nm gemessen (vgl. Adler *et al.*, 1971).

Die peptidergen, nach Spezialfärbungen „Gomori-positiven“ neurosekretorischen Ganglienzellen ließen sich nur an Hand ihrer Größe und Form unterscheiden (Kerngröße: Längsdurchmesser $6,6 \pm 1,4 \mu\text{m}$; Querdurchmesser $3,7 \pm 1,2 \mu\text{m}$ ($n = 100$); Größe des Perikaryon: Längsdurchmesser $17,4 \pm 2,9 \mu\text{m}$; Querdurchmesser $11,1 \pm 2,3 \mu\text{m}$ ($n = 100$).) Diese Nervenzellen gehören im Oberschlundganglion des Regenwurms zur kleinsten Ganglienzellklasse und können dadurch gut von anderen Neuronen abgegrenzt werden (vgl. E. u. B. Scharrer, 1937; Harms, 1948; Hubl, 1953). Der Größenvergleich dieser Neurone im Nativpräparat (wasserfreies Glycerin) mit solchen, die sich nach Paraldehydfuchsin-Färbung tingiert haben, zeigt, daß die Abmessungen etwa übereinstimmen (vgl. Abb. 1 e mit f). Nachfixierung in Bouinscher Lösung und die Voroxydation mit KMnO_4 verursachen zwangsläufig eine Schrumpfung. Auch im selektiv gefärbten Querschnitt eines Oberschlundganglions kann man nicht mit Sicherheit entscheiden, welche der „Gomori-positiven“ Neurone aktiv den Wasserhaushalt von *Lumbricus terrestris* steuern (Aros und Bodnar, 1960). Aus diesem Grund wurden etwa 50 Zellen pro Tier photometriert, wobei pro Cytoplasma- und Kernfläche je 4 Punktmessungen erfolgten. Auf die Streulichtkorrektur der Meßwerte (vgl. Sandritter, 1958) wurde verzichtet, da die unspezifische Absorption bei 313 nm zwischen den vier verschiedenen Tiergruppen mit 8–10% konstant blieb und für Vergleiche innerhalb der Meßreihe keine Absolutwerte erforderlich waren.

Statistik

Die Meßwerte wurden zunächst auf Homogenität innerhalb der Tiergruppe eines Zeitintervalls mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse überprüft (Sachs, 1972). Anschließend wurden die Mittelwerte homogener Tiergruppen aufeinanderfolgender Zeitintervalle auf Unterschiede mit dem *t*-Test für unverbundene Stichproben ($\alpha = 0,05$) untersucht. Die in bestimmten Phasen des Dehydrations-Experiments auftretenden Extinktionsunterschiede der nukleären und cytoplasmatischen Protein- und Nucleinsäureabsorption peptiderger Neurone wurden auf korrelative Zusammenhänge mit den cytometrischen Meßwertänderungen im gleichen Zeitintervall getestet. Die Signifikanz der Korrelationskoeffizienten gegenüber „0“ wurde ebenfalls geprüft ($\alpha = 0,05$).

Befunde

Die Membranbarrieren, über die beim Regenwurm der Wasser- und Elektrolytaustausch mit der Umgebung erfolgt, liegen im Bereich der Epidermis, der

² Herrn Prof. Dr. K. Noeske (Pathologisches Institut der Justus Liebig-Universität, Gießen) sei für Beratung bei der Versuchsplanung gedankt.

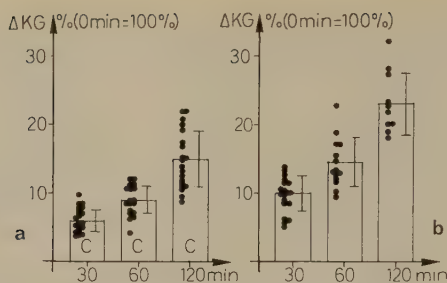


Abb. 2a u. b. Körpergewichtsabnahme von *Lumbricus terrestris* während zweistündiger Dehydration. Ausgangsgewicht zu Versuchsbeginn = 100%. Abnahme in % des Ausgangsgewichts. a) Kontrolltiere. b) Tiere nach Entfernung von Ober-, Unterschlundganglion und einem Stück Bauchmark zwischen 10.—15. Segment hinter dem Clitellum. Die Körpergewichtsabnahme der operierten Tiergruppe ist signifikant größer als die der Kontrollgruppe (Δt 30 min: $\hat{t}_{0,05} = 6,02$; Δt 60 min: $\hat{t}_{0,05} = 5,25$; Δt 120 min: $\hat{t}_{0,05} = 4,96$)

Nephridien und des Darmkanals. Funktionseinheiten, die aus der Basallamina und den angrenzenden Epithelzellen bestehen, bestimmen Richtung und Größe der Austauschprozesse an den inneren und äußeren Körperoberflächen. Die Aktivitätsschwankungen der verschiedenartigen beteiligten Zelltypen hängen von segmentalen, nervösen und zentralen, neuroendokrinen Einflüssen ab. Cytologisch sichtbare Zeichen der Zellaktivität sind Schleimgehalt der Epidermiszellen, Tubulusweite und Epithelhöhe der Nephridialkanäle, sowie Zellkerngröße von Darmepithel und Chloragogenzellen an der Grenze zwischen Darmlumen und Coelomhöhle (vgl. S. 105—107). Aus dem zeitlichen Verlauf dieser quantifizierbaren Zellreaktionen, sowie dem Vergleich der Meßwerte zwischen Kontrolltieren und den am Zentralnervensystem operierten Regenwürmern kann auf die unterschiedliche Beeinflussbarkeit der drei verschiedenen Membranbarrieren geschlossen werden.

Der während der zweistündigen Dehydration eintretende Gesamtverlust an Körperflüssigkeiten ergibt sich aus der fortlaufenden Bestimmung des Körpergewichts. Regenwürmer ohne Ober- und Unterschlundganglion lassen schon 30 min nach Versuchsbeginn eine stärkere prozentuale Abnahme des Körpergewichts (Kontrollgewicht vor Beginn des Experiments = 100%) erkennen als das entsprechende scheinoperierte Kollektiv (Abb. 2). Dieser Trend ist bis zum 2 Stunden-Intervall erkennbar.

Die getrennte Untersuchung der Reaktionen von Epidermiszellen, Tubuluszellen der Nephridien und Darmepithel- bzw. Chloragogenzellen im Verlauf des Dehydrations-Experiments führt zu den folgenden Ergebnissen:

1. Epidermis

Kontrolltiere und operierte Regenwürmer zeigen eine gleichgerichtete initiale Abnahme der Volumendichte von granulagefüllten schleimproduzierenden Drüsenzellen und granulafreien Stützzellen. Dieser im ersten 30 min-Intervall nach dem Versuchsbeginn erreichte Status bleibt über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu stationär (Abb. 3). Der Anteil schleimhaltiger Epidermis-

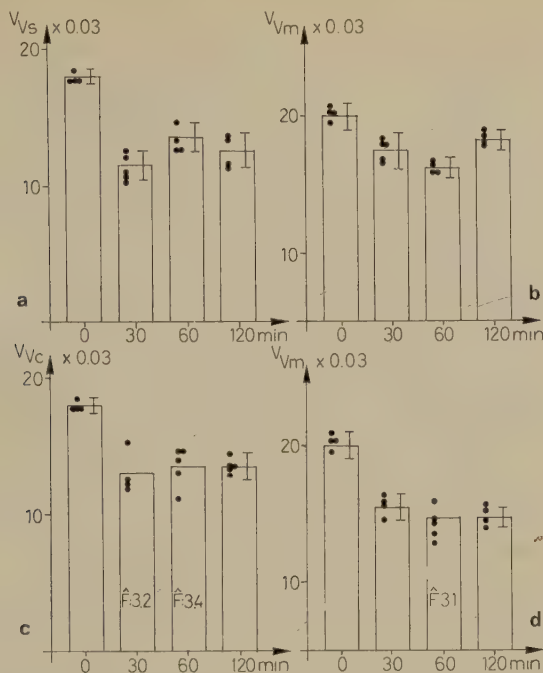


Abb. 3a—d. Reaktion der Epidermiszellen von *Lumbricus terrestris* auf den permanenten Flüssigkeitsverlust. Volumendichten der schleimproduzierenden Epidermiszellen (V_{Vm}) und der Stützzellen (V_{Vs}). a, b) Kontrolltiere; c, d) operierte Tiere. Kontrolltiere und am Nervensystem operierte Regenwürmer reagieren auf die Dehydratation mit einer initialen Abnahme der Volumendichten beider Zelltypen (30 min-Intervall). Der Anteil schleimgefüllter Epidermiszellen ist höher in der Kontrolltiergruppe. ($\hat{t}_{0,05} = 3,62$ im 30 min-Intervall, $\hat{t}_{0,05} = 7,26$ im 120 min-Intervall; vgl. b mit d)

zellen ist jedoch in den Segmenten 10.—15. hinter dem Clitellum der Kontrolltiere größer als in den vergleichbaren Segmenten der operierten Regenwürmer (vgl. Abb. 3b u. d).

2. Nephridien

Das Reaktionsvermögen des Zilienkanals auf den permanenten Flüssigkeitsverlust zeigt in beiden Tiergruppen die an Epidermiszellen beobachtete Kinetik. Innerhalb von 30 min verkleinert sich der Quotient aus innerem und äußerem Umfang dieses Tubulusabschnittes und bleibt bis zum Versuchsende konstant unterhalb des Ausgangswertes (vgl. Abb. 4a mit c). Demgegenüber besitzt der Stäbchenkanal, gemessen an den phasenhaften Schwankungen seines Quotienten, eine größere Modulationsfähigkeit innerhalb des Kontrolltier-Kollektivs: Auf eine Zunahme der Relation von innerem zu äußerem Tubulusumfang im 30 min-Intervall folgt eine Abnahme nach 60 min, die von einer erneuten, stärkeren Zunahme nach 2 Std abgelöst wird (Abb. 4b).

Im Gegensatz hierzu reagieren Stäbchenkanäle von Nephridien aus Segmenten ohne Bauchmark sowie ohne Ober- und Unterschlundganglion monoton. Nach

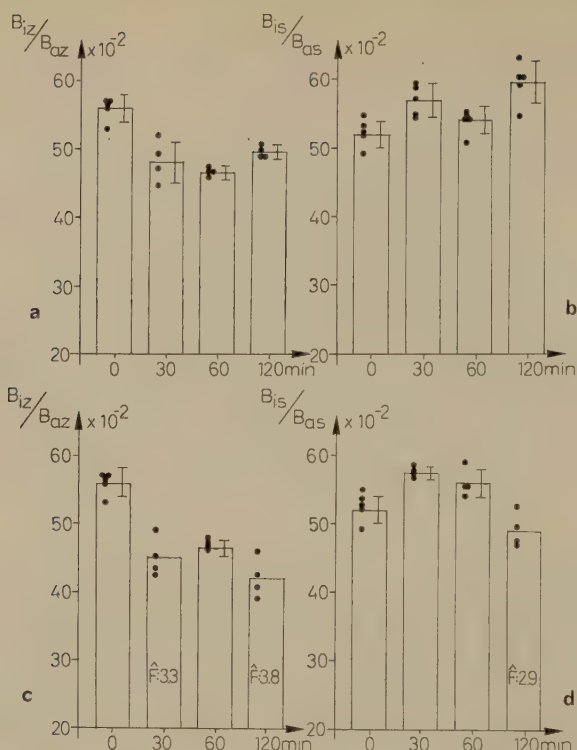


Abb. 4a—d. Reaktion der Nephridien von *Lumbricus terrestris* auf den permanenten Flüssigkeitsverlust. Messung des inneren und äußeren Umfangs von Zilienkanal (B_{iz} , B_{az}) und Stäbchenkanal (B_{is} , B_{as}). a u. b) Kontrolltiere. a) Zilienkanal. Der Quotient (B_{iz}/B_{az}) fällt 30 min nach Versuchsbeginn ab und schwankt nur gering um diesen niedrigen Wert während des Dehydrations-Experiments. b) Stäbchenkanal. Initiale Vergrößerung (30 min-Intervall) des Quotienten (B_{is}/B_{as}) ($\hat{t}_{0.05} = 4.23$). Im Zeitraum von 30—60 min nach Versuchsbeginn erfolgt Abnahme des Quotienten im letzten Intervall (60—120 min) ($\hat{t}_{0.05} = 2.63$). c u. d) Operierte Tiere ohne Bauchmark in den Segmenten 10.—15. hinter dem Clitellum. c) Bis zum 60 min-Intervall stimmen die Reaktionen des Zilienkanals von operierten Regenwürmern und Kontrolltieren überein. 120 min nach Versuchsbeginn werden in der operierten Tiergruppe niedrigere Quotientenwerte gemessen (minimale Differenz der Mittelwerte zwischen Kontrolle und operierten Tieren: $\hat{t}_{0.05} = 30.4$). d) Reaktion des Stäbchenkanals von operierten Tieren. Keine phasenhaften Schwankungen des Quotientenwertes nachweisbar

der in beiden Tiergruppen gleichgerichteten initialen Vergrößerung des Quotienten geht dieser in den operierten Tieren allmählich auf das Ausgangsniveau zurück, das 120 min nach Versuchsbeginn erreicht wird (Abb. 4d).

3. Darmkanal

Am Aufbau der Austauschfläche zwischen Darmlumen und Coelomhöhle sind zwei unterschiedliche Zelltypen beteiligt: Darmepithelzellen, deren apikale Cytoplasmamembranen in das Darmlumen hineinragen und Chloragogenzellen, deren apikale Zellmembranen in die Coelomflüssigkeit eintauchen. Während die Zell-

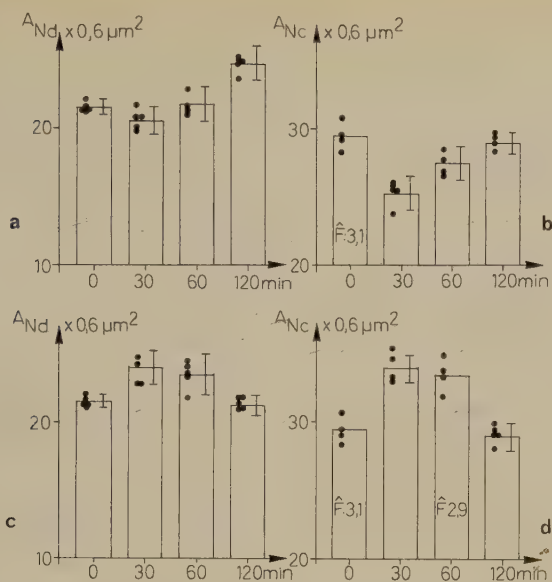


Abb. 5a—d. Änderung der Zellkernfläche von Darmepithelzellen (a, c) und Chloragogenzellen (b, d) von *Lumbricus terrestris* im Verlauf der Dehydratation über 2 Std. Kontrolltiere (a, b): während sich die Kerne der Darmepithelzellen (a) vergrößern (Differenz der Mittelwerte zwischen 60 min und 120 min signifikant: $\hat{f}_{0,05} = 9,30$), nimmt die Kernfläche der Chloragogenzellen (b) 30 min nach dem Versuchsbeginn ab ($\hat{f}_{0,05} = 14,61$), um später wieder den Ausgangswert zu erreichen. Operierte Tiere (c, d): Zwischen 30 und 60 min nach Versuchsbeginn reagieren Darmepithel- und Chloragogenzellen mit einer Kernflächenzunahme, die nach 2 Std nicht mehr nachweisbar ist

kerne der Darmepithelzellen von Kontrolltieren im Verlauf von 2 Std allmählich größer werden (Abb. 5a), beobachtet man in vergleichbaren Darmabschnitten der operierten Regenwürmer während der ersten 30 min eine Kerngrößenzunahme, die auch nach 60 min nachweisbar ist. 120 min nach Versuchsbeginn stellt sich wieder der Ausgangswert ein (Abb. 5c). Die benachbarten Chloragogenzellen reagieren in den bauchmarksfreien Segmenten synchron mit den Darmepithelzellen (Abb. 5d); demgegenüber ist in der Kontrolltiergruppe eine spiegelbildliche Kerngrößenabnahme der Chloragogenzellen in den ersten 30 min feststellbar, die nach 2 Std auf das Ausgangsniveau zurückkehrt (Abb. 5b).

Aus den cytometrischen Untersuchungen der Zellreaktionen in der Epidermis, den Nephridialkanälen und an der Darm-Coelom-Grenzfläche geht hervor, daß das Reaktionsvermögen von Epidermiszellen im Verlauf des zweistündigen Dehydrations-Experiments keine wesentlichen Unterschiede zwischen operierten Regenwürmern und Kontrolltieren aufweist. Demgegenüber verlieren die Tubuluszellen des Stäbchenkanals in den bauchmarksfreien Segmenten ihre Modulationsfähigkeit. Auch Darmepithel- und Chloragogenzellen der operierten Tiere zeichnen sich — im Vergleich zur Kontrollgruppe — durch eine entgegengesetzte Reaktionskinetik aus.

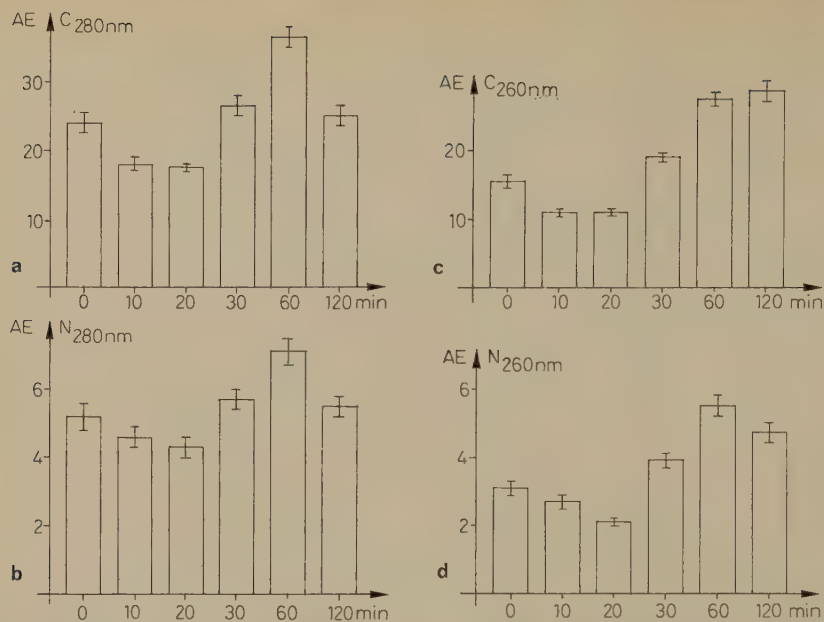


Abb. 6a—d. Änderung von Nucleinsäure- (260 nm) und Proteinkonzentration (280 nm) im Cytoplasma (C) und Kern (N) „Gomori-positiver“ Neurone des Oberschlundganglions von *Lumbricus terrestris* während einer zweistündigen Dehydratation. Meßwerte in Relativeinheiten ($AE = \text{Extinktion} \times \text{Kern- bzw. Cytoplasmafläche}$). Anzahl der gemessenen Zellen pro Tier: $n = 50$. Errechnung der Mittelwerte aus der Gesamtzahl aller Messungen pro Zeitintervall ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). Während cytoplasmatische Protein- und Nucleinsäurekonzentration schon nach 10 min abfallen (vgl. a mit c: $\hat{t}_{0,05} = 5,65$ für Proteine im Cytoplasma und $\hat{t}_{0,05} = 5,87$ für Nucleinsäure), beobachtet man diesen Prozeß im Zellkern erst nach 20 min (vgl. b mit d; $\hat{t}_{0,05} = 8,31$ für Nucleinsäure und $\hat{t}_{0,05} = 5,78$ für Proteine im Zellkern). 60 min nach Versuchsbeginn steigt der Gehalt von Nucleinsäure und Proteinen im Kern und im Cytoplasma synchron an. Einen signifikanten Abfall der Extinktionswerte bei 280 nm mißt man im Kern und Cytoplasma zwischen 60 und 120 min. In diesem Zeitintervall nimmt auch der Gehalt an Nucleinsäuren im Kern ab ($\hat{t}_{0,05} = 3,73$)

Diese cytometrischen Befunde sollen nun mit den mikrospektrographischen Bestimmungen des relativen Nucleinsäure- und Proteingehalts peptiderger Neurone im Oberschlundganglion in entsprechenden Zeitintervallen verglichen werden. Im Cytoplasma der „Gomori-positiven“ Neurone sinkt die Extinktion bei 260 nm und 280 nm schon 10 min nach Beginn der Dehydratation ab und bleibt bis zum 20min-Intervall konstant erniedrigt, (vgl. Abb. 6a mit c), während die vergleichbaren Werte im Zellkern erst nach 20 min ihr Minimum erreichen (vgl. Abb. 6b mit d).

Hieraus kann man ableiten, daß die Aktivierung der peptidergen Neurone sich zunächst auf die Protein- und Nucleinsäurekonzentration des perinucleären Cytoplasmas auswirkt, um später auch auf den Kern überzugreifen. Zwischen 20 und 60 min steigt der Gehalt von Proteinen und Nucleinsäuren synchron im Kern und Cytoplasma über die Ausgangswerte an. Offensichtlich findet in diesem Intervall die Neusynthese von Peptidhormonen statt, die während der voran-

gegangenen 20 min sezerniert wurden. Zwischen 60 min und 120 min beobachtet man einen erneuten Abfall der Extinktion bei 280 nm im Cytoplasma und Kern, während bei 260 nm die Werte im Cytoplasma konstant hoch bleiben und im Zellkern geringfügig absinken. Die Dissoziation zwischen den Meßwerten bei 280 nm und 260 nm spricht für die Annahme, daß trotz kontinuierlicher Sekretion die Neusynthese von Peptidhormonen weiterläuft, sichtbar an der hohen cytoplasmatischen Nucleinsäurenkonzentration.

Diese zyklischen Schwankungen der nucleinsäuregesteuerten Proteinsynthese in Peptide sezernierenden Neuronen können mit ähnlichen phasenhaften Aktivitätsänderungen der Zellen verglichen werden, die am Aufbau der drei Membranbarrieren — Epidermis, Nephridien, Darmkanal — beteiligt sind. Nur die Aktivitätsschwankungen des Stäbchenkanals oszillieren in Phase mit dem Sekretionszyklus der „Gomori-positiven“ Neurone des Oberschlundganglions (vgl. Abb. 4b mit 6). Jedoch auch die Reaktionsfähigkeit von Darmepithel- und Chloragogenzellen scheint von zentralnervösen Faktoren abzuhängen, da sich ihre Reaktionskinetik in bauchmarksfreien Segmenten umkehrt (vgl. Abb. 5). Während der zweistündigen Dehydratation reagieren die Epidermiszellen mit einer überschießenden Schleimabgabe (vgl. Abb. 3b mit d).

Die Vergleichsmessungen zeigen, daß bei *Lumbricus terrestris* die an der Regulation von Wasser- und Elektrolytaustausch beteiligten Organe 1. unter neuroendokriner Kontrolle der „Gomori-positiven“ Nervenzellen des Oberschlundganglions stehen und 2. ferner auch ein Einfluß der segmentalen Innervation zu erkennen ist. Während die Kontrollfunktion peptiderger Neurone des Oberschlundganglions durch die Experimente von Kamemoto (1964) belegt werden kann, steht der exakte Nachweis einer Einflußnahme „Gomori-positiver“ Ganglienzellen im Bauchmark noch aus. Die Studien von Hubl (1953), Herlant-Meewis (1957) und Aros und Vigh (1959) konnten nur eine Aktivierung der segmentalen „Gomori-positiven“ Neurone im Verlauf von Regenerationsvorgängen im Bauchmark, während der Sexualentwicklung und durch intensive ultraviolette Strahlenwirkung bestätigen. Da jedoch die untersuchten Austauschorgane des Elektrolyt- und Wasserhaushalts — Nephridien, Darm und Integument — von einem dichten Nervenfasernetz umgeben sind, das sich aus Axonen segmental angeordneter, nicht „Gomori-positiver“ Ganglienzellen aufbaut (s. Diskussion), muß im Zusammenhang mit den vorgelegten eigenen Befunden an eine segmental-nervöse Beeinflussung der Austauschfunktion von Nephridial-, Darm- und Epidermisepithel gedacht werden.

Diskussion

Oligochaeten müssen sich vor Wasserverlusten durch die oralen und analen Körperöffnungen, die dorsalen Poren, die Nephridien sowie durch die permanente Schleimsekretion der Epidermis schützen. Sie benötigen hierzu ein Regelsystem, das für die Koordination der Prozesse an den verschiedenen Grenzflächen sorgt. Schon Overton (1904) wies darauf hin, daß bei Regenwürmern Hautpermeabilität und Eliminationsfunktion der Nephridien eng gekoppelt sein müssen, „damit der osmotische Druck der Säfte auf einer gewissen Höhe bleibt, resp. keinen allzu starken Schwankungen unterworfen wird“. Diese Vermutung Overtons wurde bei

Lumbricus terrestris von Ramsay (1949) durch exakte Messungen des osmotischen Druckes und der Chloridkonzentration von Coelomflüssigkeit, Blut und Urin belegt; danach diffundiert Wasser passiv durch die Haut entsprechend dem osmotischen Gradienten, während der transcutane Ionenaustausch von aktiven und passiven Prozessen abhängt. Die Homöostase wird aufrechterhalten, indem durch aktive nephridiale Sekretionsprozesse ein hypotoner Urin gegen einen Konzentrationsgradienten produziert wird. Die letztgenannten Beobachtungen wurden von Boroffka (1965) bestätigt und die funktionellen sowie morphologischen Parallelen zwischen den austauschaktiven Tubulusabschnitten der Wirbeltierniere und des Regenwurmephridium hervorgehoben (vgl. Graszynski, 1963).

Erste Hinweise auf ein übergeordnetes Regelzentrum für den Wasser- und Elektrolythaushalt des Regenwurms stammen von Maluf (1939); er durchtrennte das Bauchmark von *Lumbricus terrestris* und stellte nach Immersion der Tiere in Wasser eine stärkere Gewichtszunahme fest. Maluf nahm an, daß im Cerebralganglion (Oberschlundganglion) des Regenwurms Neurone liegen, die ihr Axon in das Bauchmark entsenden, um über die Segmentalnerven die Hautpermeabilität zu beeinflussen. Obwohl in der Epidermis NaCl-empfindliche rezeptive Strukturen liegen, konnte Laverack (1962) mit elektrophysiologischer Methodik keine efferenten Bahnen finden, die für eine zentralnervöse, transsynaptische Steuerung des Wasser- und Elektrolytaustausches in Frage kommen. Die Suche nach direkten Bahnverbindungen zwischen Oberschlundganglion und den peripheren Effektoren in der Epidermis des Regenwurms ist nicht mehr zwingend, wenn man neurosekretorische Ganglienzellen, die bei *Lumbricus* von E. u. B. Scharrer (1937) entdeckt wurden, in Betrachtungen über osmoregulatorische Funktionen einbezieht. Da die Axone der „Gomori-positiven“ Neurone des Oberschlundganglions in einer stark vaskularisierten Neuropilzone endigen (Aros und Vigh, 1961), lag die Vermutung einer Sekretabgabe in die Blutbahn nahe. Diese Verhältnisse haben wiederum Ähnlichkeit mit dem „Gomori-positiven“ Zwischenhirn-Hinterlappensystem der Wirbeltiere. Den histologischen Studien von Aros und Bodnar (1960) sowie Otremba (1961) am Oberschlundganglion sind erste Hinweise auf eine neuroendokrine hämatogene Steuerung des Wasser- und Elektrolythaushalts von Lumbriciden zu entnehmen. Nach längerem Aufenthalt in trockenem Milieu bzw. in hyper- und hypotonischen NaCl-Lösungen reagierten die „Gomori-positiven“ Ganglienzellen in einer ersten Phase mit der Vakuolisierung ihres Cytoplasmas. In der zweiten Phase (Restitutionsphase) erschienen zuerst perinucleäre Nissl-Schollen, die im weiteren Verlauf durch „Gomori-positive“ Sekretionsprodukte in cytoplasmatische Randbezirke abgedrängt werden. Da auch bei den Kontrolltieren dieser Untersuchungsreihe verschiedene Sekretionsphasen „Gomori-positiver“ Neurone nebeneinander vorlagen, war eine exakte Zuordnung bestimmter Sekretionsbilder zu den entsprechenden physiologischen Stimulationseffekten nicht möglich. Erst Kamemoto (1964) bewies den neuroendokrinen Einfluß des Oberschlundganglions auf die Osmoregulation von *Lumbricus terrestris* und *Eisenia foetida* (vgl. S. 104).

Als Zielorgane dieses Regelzentrums gelten Epidermis, Nephridien und Darmwand. Die cytologischen und physiologischen Ähnlichkeiten zwischen Nephridialkanälen der Oligochaeten und Nierentubuli von Vertebraten (Graszynski, 1963) berechtigt zur Hypothese, daß auch bei Regenwürmern das Konzentrations-

vermögen der nephridialen Tubuluszellen hormonell gesteuert wird. Die abweichenden cytometrischen Ergebnisse am Zilienkanal einerseits und Stäbchenkanal andererseits (s.S. 109—110) zeigen, daß 1. auch die beiden Tubulusabschnitte unterschiedlich auf den Dauerstimulus durch permanenten Flüssigkeitsverlust reagieren und 2. die Aktivitätsschwankungen des Stäbchenkanals in Phase mit den Konzentrationsänderungen von Proteinen in peptidergen Neuronen des Oberschlundganglions oszillieren (vgl. Abb. 4 mit Abb. 6). Boroffka (1965) demonstrierte durch Punktion verschiedener Tubulusabschnitte des Nephridialkanals, daß im Zilienkanal die Konservierungsprozesse für Elektrolyte beginnen und in Richtung auf den Stäbchenkanal an Wirksamkeit zunehmen.

Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten aus den Änderungen der Extinktion bei 280 nm bzw. 260 nm im Kern- und Cytoplasma „Gomori-positiver“ Neurone des Oberschlundganglions sowie der Quotienten aus Epithelhöhe und Tubulusweite von Zilien- und Stäbchenkanal ergibt, daß in den ersten 30 min nach Beginn des Dehydrationsexperiments der Zilienkanal im Mittelpunkt der neuroendokrin gesteuerten Gegenregulation steht: Die Meßwertänderungen des Zilienkanals sind durch 6 signifikante Korrelationen mit denen anderer Komponenten des untersuchten Systems verbunden (Abb. 7a). Diese Wechselbeziehungen lassen sich in Form eines Graphen darstellen (Zimmermann und Paul, 1972); hierbei werden signifikante Korrelationen zwischen Systemkomponenten durch Verbindungslinien symbolisiert (vgl. Laue, 1970). Die anfängliche Dominanz des Zilienkanals wird im 30—60 min-Intervall von dem zunehmend aktivierten Stäbchenkanal abgelöst, der immer stärker unter den Einfluß peptiderger Neurone des Oberschlundganglions gerät. Während im 30 min-Intervall nur eine signifikante Korrelation zwischen der Reaktion des Stäbchenkanals und der Aktivierung der „Gomori-positiven“ sekretorischen Neurone nachweisbar ist, beobachtet man nach 60 min und 120 min die maximal mögliche Anzahl von 4 Korrelationen (vgl. Abb. 7a mit b).

Neben der neuroendokrinen Beeinflußbarkeit des nephridialen Tubulusapparates sollte man doch auch an die Möglichkeit einer segmentalen transsynaptischen Steuerung denken. Smallwood (1923) berichtete: „there is no organ in the earthworm more richly supplied with nerves than the nephridium“. Ein besonders dichtes Nervenetz umspannt Zilienkanal, Ampulle und Stäbchenkanal. Die eigenen Versuche zur Ausschaltung der nervösen Regelkomponente tubulärer Transportmechanismen zeigen, daß sich die Reaktion des Zilienkanals vom Regenwurm ohne Bauchmark, Ober- und Unterschlundganglion erst nach zweistündiger Dehydration von dem der Kontrolltiere unterscheidet (vgl. Abb. 4a mit c). Demgegenüber fehlen die phasenhaften Aktivierungsschwankungen des Stäbchenkanals, da der neuroendokrine Stimulus ausbleibt.

Eine Umkehr der Verlaufskurve der funktionsbedingten Kerngrößenänderung (vgl. Benninghoff, 1950) beobachtet man in Darmepithel- und Chloragogenzellen aus bauchmarksfreien Segmenten (Abb. 5). Dieser Hinweis auf eine nervöse Beeinflussung der Austauschprozesse an der Darm-Coelom-Grenze wird gestützt durch die Zunahme signifikanter Korrelationen zwischen den cytometrisch ermittelten Werten an Darmepithel- bzw. Chloragogenzellen und den Extinktionsänderungen peptiderger Neurone im Verlauf der zweistündigen Dehydration (s. Graphen in Abb. 7). Mit anderer Methodik konnte Millott (1943a, b, 1944)

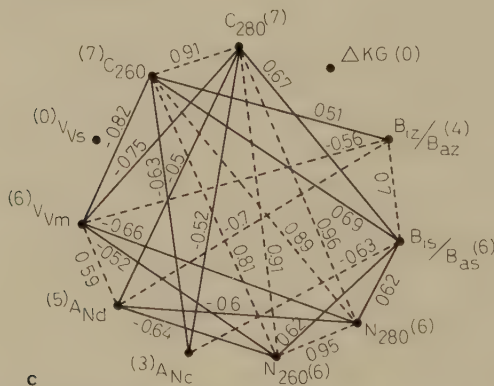
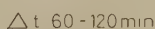
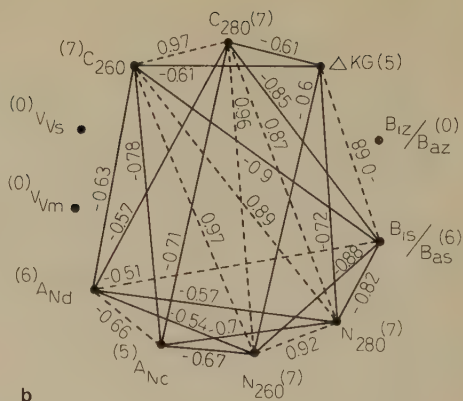
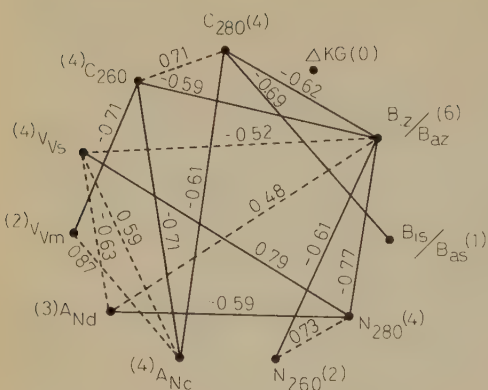
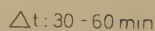
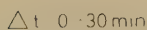


Abb. 7a—c. Darstellung signifikanter Korrelationen zwischen den Meßwertänderungen der cytometrischen und mikrospektrographischen Parameter in Form von Graphen (s.S. 115). Die Zahl signifikanter Korrelationen nimmt mit der Dauer des Dehydrationsexperiments zu (vgl. a mit b, c). 30 min nach dem Versuchsbeginn ist die Reaktion des Zilienkanals durch signifikante Korrelationen mit den Änderungen der Extinktionswerte in den „Gomori-positiven“ Neuronen des Oberschlundganglions verbunden (—). Demgegenüber steht der Stäbchenkanal 60 und 120 min nach Versuchsbeginn unter dem neuroendokrinen Einfluß des Oberschlundganglions. (Die maximal mögliche Anzahl von 4 Korrelationen wird erreicht). Auch zwischen den reaktiven Kerngrößenänderungen von Darmepithel- bzw. Chloragogenzellen und anderen Parameterwerten entwickeln sich im Verlauf der Dehydratation zunehmend korrelative Beziehungen (Anzahl der Korrelationen (n))

zeigen, daß der Tonus des Darmkanals von *Lumbricus terrestris* unter sympathischer und parasympatischer Kontrolle steht. Außerdem wird die Sekretion proteolytischer Fermente durch elektrische Stimulation des peritonealen Nervennetzes gesteigert; histologisch sind dann keine Granula in den Drüsenzellen des Darmepithels nachweisbar.

Interessanterweise bestehen auch zwischen Chloragogenzellen und den peptidergen Neuronen des Oberschlundganglions korrelative Wechselbeziehungen (s. Graph in Abb. 7).

Eine direkte Beeinflussung der Funktion von Chloragogenzellen durch Neurohormone des Oberschlundganglions konnte bei Lumbriciden noch nicht nachgewiesen werden. Jedoch läßt sich aus den signifikanten Korrelationen zwischen der Aktivitätsänderung peptiderger Neurone (gemessen an der Änderung der zellulären Nucleinsäure- bzw. Proteinkonzentration) und der der Chloragogenzellen (gemessen an der Änderung der Kernfläche) auf gegenseitige funktionelle Abhängigkeiten schließen: Chloragogenzellen gelten als Hauptspeicher von Fetten und Glykogen und sind daher an Stoffwechselprozessen beteiligt, die diese beiden Substrate als Energiequellen benötigen (Lindner, 1965; Valembois und Cazaux, 1970). Da der gerichtete Transport über die Membranbarrieren von Darm und Nephridien stark energieabhängig ist, dürfte die im Dehydrations-Experiment beobachtete Funktionssteigerung der Chloragogenzellen Ausdruck der vermehrten Fett- und Kohlenhydratmobilisation zur Deckung des Energiebedarfs der durch Neurohormone der Oberschlundganglions aktivierten nephridialen Tubulus- und Darmepithelzellen sein.

Die kombinierten cytometrischen und mikrospektrographischen Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen erkennen, daß die Aufrechterhaltung der Wasser- und Elektrolytbalance auch bei *Lumbricus terrestris* von der Funktionsfähigkeit eines zentralnervösen Regelsystems abhängt. Die Koordination der Barrierefunktion von Integument, Darm und Nephridien erfolgt zentral durch funktionelle Koppelung von neurosekretorischen peptidergen Neuronen des Oberschlundganglions mit Ganglienzellen des Bauchmarks, die am Aufbau des peritonealen und subepidermalen Nervennetzes beteiligt sind.

Literatur

- Adler, C.P., Schlüter, G., Sandritter, W.: Ultraviolett-mikrospektrophotometrische Untersuchungen am Cytoplasma von Herzmuskelzellen. Beitr. Path. **143**, 126—156 (1971)
- Aros, B., Bodnar, E.: Histologische Untersuchungen über die neurohumorale Funktion von *Eisenia rosea* (Oligochaeta). Symp. Biol. Hung. **1**, 191—202 (1960)
- Aros, B., Vigh, B.: Changes in the neurosecretion of the nervous system of earthworm under various external conditions. Acta biol. Acad. Sci. hung., Suppl. **3**, 47 (1959)
- Aros, B., Vigh, B.: Neurosecretory activity of the central and peripheral nervous system in the earthworm. Acta biol. Acad. Sci. hung. **12**, 169—186 (1961)
- Bahl, K.N.: Excretion in the oligochaeta. Biol. Rev. **22**, 109—147 (1947)
- Bennett, M.F., Willis, M.H.: The brain and rhythmicity in earthworms. Z. vergl. Zool. **53**, 95—98 (1966)
- Benninghoff, A.: Funktionelle Kernschwellung und Kernschrumpfung. Anat. Nachr. **1**, 50—52 (1950)
- Boroffka, I.: Elektrolyttransport im Nephridium von *Lumbricus terrestris*. Z. vergl. Zool. **51**, 25—48 (1965)
- Cordier, R.: Etudes histophysiologiques sur la néphridie du Lombric. Arch. Biol. (Liège) **45**, 431—471 (1934)
- Dietz, T.H., Alvarado, R.H.: Osmotic and ionic regulation in *Lumbricus terrestris* L. Biol. Bull. **138**, 247—261 (1970)
- Graszynski, K.: Die Feinstruktur des Nephridialkanals von *Lumbricus terrestris* L. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung. Zool. Beitr. **8**, 189—296 (1963)
- Harms, J.W.: Über ein inkretorisches Cerebralorgan bei Lumbriciden, sowie Beschreibung eines verwandten Organs bei drei neuen *Lycastis*-Arten. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **143**, 332—346 (1948)
- Herlant-Meewis, H.: Reproduction et neurosécrétion chez *Eisenia foetida* (Sav.) Ann. Soc. Roy. Zool. Belg. **87**, 151—185 (1957)
- Hubl, H.: Die inkretorischen Zellelemente im Gehirn der Lumbriciden. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **146**, 421—437 (1953)
- Jackson, C.M.: Storage of water in various parts of the earthworm at different stages of exsiccation. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **23**, 500—504 (1926)
- Kamemoto, F.I.: The influence of the brain on osmotic and ionic regulation in earthworms. Gen. comp. Endocr. **4**, 420—426 (1964)

- Laue, R.: Elemente der Graphentheorie und ihre Anwendung in den biologischen Wissenschaften. Leipzig: Geist u. Portig 1970
- Lindner, E.: Ferritin und Hämoglobin im Chloragogen von Lumbriciden (Oligochaeta). Z. Zellforsch. **66**, 891—913 (1965)
- Maluf, N.S.R.: The volume- and osmoregulative functions of the alimentary tract of the earthworm (*Lumbricus terrestris*) and on the absorption of the chlorid from freshwater by this animal. Zool. Jb. Abt. allg. Zool. u. Physiol. **59**, 535—552 (1939)
- Maluf, N.S.R.: Osmo- and volume regulation in the earthworm with special reference to the alimentary tract. J. cell. comp. Physiol. **16**, 175—187 (1940)
- Millott, N.: The visceral nervous system of the earthworm. I. Nerves controlling the tone of the alimentary canal. Proc. roy. Soc. B **131**, 271—295 (1943a)
- Millott, N.: The visceral nervous system of the earthworm. II. Evidence of chemical transmission and the action of sympathomimetic and parasympathomimetic drugs on the tone of the alimentary canal. Proc. roy. Soc. B **131**, 362—373 (1943b)
- Millott, N.: The visceral nerves of the earthworm. III. Nerves controlling secretion of protease in the anterior intestine. Proc. roy. Soc. B **132**, 200—212 (1944)
- Otremba, P.: Beobachtungen an neurosekretorischen Zellen des Regenwurms (*Lumbricus spec.*). Z. Zellforsch. **54**, 421—436 (1961)
- Overton, E.: Neununddreißig Thesen über die Wasserökonomie der Amphibien und die osmotischen Eigenschaften der Amphibienhaut. Verh. phys.-med. Gesellsch. Würzburg **26**, 277—295 (1904)
- Ramsay, J. A.: The site of formation of hypotonic urine in the nephridium of *Lumbricus*. J. exp. Biol. **26**, 65—75 (1949)
- Roots, B.I.: The water relations of earthworms. I. The activity of nephrostome cilia of *Lumbricus terrestris* L. and *Allolobophora chlorotica* Savigny. J. exp. Biol. **32**, 765—774 (1955)
- Roots, B.I.: The water relations of earthworms. II. Resistance to desiccation and immersion, and behavior when submerged and when allowed the choice of environment. J. exp. Biol. **33**, 29—44 (1956)
- Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972
- Sandritter, W.: Ultraviolett-Mikrospektrophotometrie. In: Handbuch der Histochemie I/1, S. 220—338. Stuttgart: Fischer 1958
- Scharrer, E., Scharrer, B.: Über Drüsen-Nervenzellen und neurosekretorische Organe bei Wirbellosen und Wirbeltieren. Biol. Rev. **12**, 185—216 (1937)
- Smallwood, W.M.: The peripheral nervous system of the common earthworm, *Lumbricus terrestris*. J. comp. Neurol. **42**, 35—55 (1926)
- Valembos, P., Cazaux, M.: Etude autoradiographique du rôle trophique des cellules chloragogenes des vers de terre. C. R. Soc. Biol. (Paris) **164**, 1015—1018 (1970)
- Weibel, E.R., Elias, H.: Quantitative Methoden in der Morphologie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967
- Wolf, A.V.: Studies on the behaviour of *L. terrestris* and evidence for a dehydration tropism. Ecology **19**, 233—242 (1938)
- Zimmermann, P.: Die zentralnervöse Kontrolle der Dehydratation bei *Lumbricus terrestris* L. Z. Zellforsch. **112**, 551—571 (1971)
- Zimmermann, P., Paul, E.: Reaktionsmuster verschiedener Mittel- und Zwischenhirnzentren von *Rana temporaria* L. nach Unterbrechung der Nervenbahnen des Pinealkomplexes. Z. Zellforsch. **128**, 512—537 (1972)

Dr. P. Zimmermann
Zentrum für Anatomie und Cytobiologie
Justus Liebig-Universität
D-6300 Giessen
Friedrichstr. 24
Bundesrepublik Deutschland

Kälteinduzierte Ödem- und Nekroseentwicklung im Parietal-
cortex von Kaninchen.⁺

P. Zimmermann, C. Gagel, H. Zimmermann⁺⁺ und I. Müller

Zentrum für Anatomie und Cytobiologie, Justus Liebig-Universi-
tät Giessen (Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Oksche)
und

Zentrum für Innere Medizin, Justus Liebig-Universität Giessen
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-G. Lasch)

+ Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft

++ Z. Zt. W. Kerckhoff-Klinik der Max Planck-Gesellschaft,
Bad Nauheim

Zusammenfassung.

Durch Einwirkung von flüssigem Stickstoff auf das linke Os parietale des Kaninchens wurde ein reproduzierbares Hirnödem erzeugt und über 24 Stunden verfolgt (Durchmesser der Nekrosezone etwa 1,5 cm nach 24 Std.).

Innerhalb der ersten 30 min. nach der Läsion beobachtet man eine Abnahme des Hämostasepotentials im intrakraniellen Gefäßkompartiment; extrakraniell fällt noch kein Gerinnungsdefekt auf. Cytometrisch untersucht wurden die Rindenschichten I. (Glialeuropil) und II. (Neuron-Glia-Komplexe) in der Läsionszone und im korrespondierenden kontralateralen Hirnabschnitt. Im traumatisierten Cortex-Areal reagieren Endothel-, Glia- und Ganglienzellen der Rindenschicht II. mit einer Zunahme ihrer Kerngröße, während im entsprechenden kontralateralen Hirnareal neben der initialen Abnahme der Kapillarlänge nur eine Kernvergrößerung von Endothelzellen meßbar sind. Jedoch weist die an elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmte Durchmesserzunahme der kernfreien Endothelzellprofile und der perikapillären Gliafortsätze auf eine frühzeitige transhemisphärische Ausbreitung der läsionsbedingten Funktionsstörung im linken Cortex hin. Die Korrelationsanalyse dieser ersten Ödemphase ergibt signifikante Korrelationen ausschließlich zwischen den Kerngrößenänderungen von Endothel-, Glia- und Ganglienzellen des traumatisierten linksseitigen Cortex-Areals.

Die zweite Phase des kälteinduzierten Hirnödems beginnt 60 min. nach dem Experiment mit einer Steigerung der Gerinnungsbereitschaft, die nach 12 Stunden in eine Hypokoagulabilität übergeht. In diesem Stadium werden die Zellelemente der rechten Hemisphäre zunehmend von der Ödemausbreitung in der linken Hirnhälfte beeinflusst (Korrelatio-

nen s. S. 98-100.

Demnach verändern Permeabilitätsstörungen in der direkt durch Kälte geschädigten Hemisphäre lokal das Hämostasepotential und beeinträchtigen über das intrakranielle Gefäßkompartiment auch die Funktion von Nervenzell-Glia-Komplexen in der anderen Hirnhälfte.

Development of Cold-induced Brain-Edema and Cortical Necrosis in the Rabbit.

Summary

A brain edema was produced by application of liquid nitrogen to the exposed intact left os parietale of rabbits. The development of this edema was examined during the following 24 hours. (Diameter of the necrotic area after 24 hrs: about 1,5 cm).

Within the first 30 min after the lesion, a reduction of coagulability was observed only in the cerebral vessels, whereas no change of coagulability was found in the extracerebral vessels. The cortical layers I. and II. of the lesioned area and the corresponding layers of the contralateral cortical area were examined by cytometric methods. The nuclear size of the endothelial cells, glial cells and neurons increased in the cortical layer II. of the lesioned area. The corresponding right cortical area, however, only showed an initial reduction of the capillary length and an increase of the nuclear size of the endothelial cells. Measurements of electron micrographs showed an increase in diameter of the cytoplasmic profiles of the endothelial cells and of the pericapillary glial endfeet. This can be interpreted as an early spreading of the disturbed function from the lesioned cortical area to the corresponding contralateral one. During the first phase of edema significant correlations are limited to the changes between the nuclear size of endothelial cells, glial cells and neurons of the left, lesioned, cortical area.

The second phase of the edema begins 60 min after the beginning of the experiment with hypercoagulability which is followed by hypo-coagulability 12 hrs later. Endothelial, glial and nerve cells of the right hemisphere are now more and more influenced by the increasing edema of the left hemisphere (For correlations see p.98-100),

On the basis of our results it is suggested, that changes of permeability in the lesioned hemisphere locally affect blood coagulation and thus have an influence via the cerebral vessels on the function of neuronal and glial cell complexes in the contralateral hemisphere.

Key words:

Brain edema - Necrosis - Cytometry (Neurons, neuroglia, capillaries) - Blood coagulation - Rabbit.

Einleitung

Eine pathologische Volumenvergrößerung des Gehirns (V_l) führt zum Mißverhältnis zwischen dem knöchern begrenzten Schädelinnenraum (V_{ic}) und anderen intrakraniellen Kompartimenten, d.h. Liquorraum (V_{csf}), zirkulierendem Blutvolumen (V_{bl}) und normalem Hirnvolumen (V_{br}). Diese kompetitiven Wechselbeziehungen faßten RYDER u.a. (1953) formelmäßig zusammen: $V_{ic} = V_{br} + V_{bl} + V_{csf} + V_l$. Zur zeitabhängigen Registrierung von Kompartimentverdrängungen im Verlauf einer ödembedingten Zunahme des Hirnvolumens müssen für Tierversuche geeignete Ödem-Modelle gewählt werden, da klinische Untersuchungen am Patienten sich schwer standardisieren lassen. Neben der von ISHII u.a. (1959) entwickelten extraduralen Ballon-Kompression als Prototyp des Epiduralhämatoms gilt das von CLASEN u.a. (1953) und KLATZO u.a. (1958) eingeführte standardisierte Kälteödem als Modell des traumatischen Hirnödems (vgl. BAKAY und LEE, 1965). Unter der Einwirkung von extradural applizierter extremer Kälte (flüssigem Stickstoff, Kohlendisäureschnee) wird der in der Kältezone liegende Cortexabschnitt direkt geschädigt. Als Folgereaktion beschrieben KLATZO u.a. (1958) sowie BAKAY und HAQUE (1964) einen Natrium- und Wasser-einstrom in den Intrazellularraum. Von dieser zunächst lokal begrenzten direkten Läsionszone breitet sich das Ödem vor allem durch Kompression des cerebralen Gefäßkompartiments aus; letztere führt zur Minderung der Hirndurchblutung.

Aus der Senkung der arteriovenösen Druckdifferenz resultiert eine Strömungsverlangsamung (Übersicht s. GÄNSHIRT, 1957), die neben der gestörten Sauerstoffversorgung eine Herabsetzung des Glukosetransports und des Abtransports toxischer Metaboliten erkennen

läßt (OPITZ und SCHNEIDER, 1950). Auf diese Transportstörungen reagieren die gefäßabhängigen Hirngewebsareale uniform mit einer intrazellulären Flüssigkeitseinlagerung (REULEN u.a., 1970). TORACK u.a. (1959) lokalisierten beim Kälteödem die Ödemflüssigkeit in perivaskuläre Astrozytenfortsätze der Hirnrinde, während LEE und BAKAY (1966) außerdem eine Vergrößerung des Extrazellulärspaces im Markbereich feststellten. Diese elektronenmikroskopischen Befunde weisen auf ein unterschiedliches Reaktionsmuster von Nervenzell-Glia-Komplexen in Abhängigkeit vom Gefäßsystem hin (SCHOLZ, 1949).

Das differente Verhalten von Endothel-, Glia- und Nervenzellen während der Ödementwicklung läßt sich durch quantitative Bestimmung ihrer Kompartimentanteile am Hirnvolumen verfolgen und mit Datenmaterial aus physiologisch - biochemischen Untersuchungen vergleichen. Dieser Weg wird in der folgenden Arbeit beschriftet. Wechselbeziehungen zwischen Gefäßinhalt, Endothelzellen und gefäßabhängigen Hirngewebsarealen könnten durch Messung der lokalen Gerinnungsveränderungen aufgedeckt werden. Membranstörungen, die beim Hirnödem sowohl biochemisch als auch morphologisch nachgewiesen worden sind (s.o.), dürften sich auch auf das Gerinnungssystem auswirken, dessen Homöostase von der Intaktheit der Gefäßwand abhängt (Übersichten s. SCHRÖER und HAUCK, 1969; SAWYER und SRINIVASAN, 1969).

Material und Methoden

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurde männlichen und weiblichen Kaninchen (Gewicht 2 - 3 kg) in Lokalanästhesie (2 %ige Novocainlösung) ein Polyvinyl-Katheter zur Blutentnahme über die rechte Vena jugularis externa in den rechten Vorhof geschoben. Nach Kontrolle des normalen Gerinnungspotentials (Vergleichsbestimmungen erbrachten keine Unterschiede zwischen Blutproben aus der linken Vena facialis posterior und dem rechten Vorhof) wurde die Schädelhaut von einem Medianschnitt aus bis zum Ohransatz abpräpariert und seitlich weggeklappt. Anschließend wurde ein mit flüssigem Stickstoff gefüllter Messingzylinder (Durchmesser : 2 cm) etwa 0,5 cm neben der Sagittalnaht (zur Vermeidung direkter Kälteschädigung des Sinus sagittalis) kurz vor dem Ohransatz für 60 sec. auf den parietalen Schädelknochen gepreßt. 24 Std. danach ist die kältebedingte Nekrosezone auf der Cortexoberfläche durch Ausbildung eines perifokalen hyperämischen Randsaumes und Hämorrhagien im Nekrosebereich gut abgrenzbar. Dieses Cortexareal mißt im Querdurchmesser etwa 1,5 cm.

Das Tierkollektiv wurde in 7 Gruppen zu je 5 Tieren aufgeteilt (5 Kaninchen dienten als Kontrolle) und 10 min., 30 min., 60 min., 360 min., 720 min sowie 1.440 min. nach Kälteapplikation untersucht.

1. Gerinnungsuntersuchungen

Zur Bestimmung des intracerebralen Hämostasepotentials wurde die Vena facialis posterior punktiert, da das venöse Blut aus der Hirnkonvexität über den Sinus sagittalis superior in den Sinus transversus abfließt und letzterer in die Vena temporalis superficialis bzw. Vena facialis posterior mündet (YOUNG, 1970). Hierbei ließ sich die Beimischung von extracerebralem Venenblut nicht völlig vermeiden. Da nur geprüft werden sollte, ob in bestimmten Pha-

sen des kälteinduzierten Hirnödems Gerinnungsveränderungen im cerebralen Venenblut auftreten, genügte vorerst der Vergleich der Gerinnungsdaten von Blutproben aus der Vena facialis posterior und dem rechten Herzen. Nach gleichzeitiger Blutentnahme aus Herzkatheter und linker Vena facialis posterior wurden folgende Bestimmungen durchgeführt (1 : 10 Zitratblut):

- a) Thrombelastogramm nach HARTERT (1948).
- b) Fibrinogen nach RATNOFF und MENZIE (1951).
- c) Faktor V nach SCHULTZE und SCHWICK (1953).
- d) Einphasengerinnungstest nach QUICK (1937).
- e) Thrombozytenzählung nach FEISSLY und LÜDIN (1949).

Reagenzien: Faktor V, Testthrombin, Calciumthromboplastin, M/40 Calciumchlorid, Diäthylbarbiturat-Azetat-Puffer pH 7,6 (Behring-Werke, Marburg).

2. Morphologische Untersuchungen

Nach Blutentnahme wurden die Tiere durch Genickschlag getötet und innerhalb von 1 - 2 min. Hirngewebsproben aus korrespondierenden postzentralen parietalen Arealen des Cortex lateral vom Sulcus marginalis lateralis entnommen. Da der Gefäßinhalt für die Beurteilung der Gerinnungsuntersuchung wichtig war, wurde Immersionsfixation angewandt:

- a) eisgekühlte Bouínsche Lösung für Lichtmikroskopie (24 Std.) und
- b) 5 %iges Glutaraldehyd in Phosphatpuffer von pH 7,4 (60 min.) für Elektronenmikroskopie.

Hierbei ist die Bildung von Fixationsartefakten (z.B. Schwellung der Astrozyten) stärker als nach Perfusionsfixation. Um diese möglichst auszuschließen, haben wir die cytometrischen Bestimmungen nur in den oberflächennahen Schichten I. und II. des Parietalcortex vorgenommen.

Außerdem wurde nach der Trepanation sofort die gepufferte eisgekühlte 5 %ige Glutaraldehydlösung auf die Cortexoberfläche getropft und das Gewebeareal unter ständigem Spülen mit Fixierungsflüssigkeit entnommen. Dabei wurde auf Standardbedingungen bei der Fixierung und Weiterverarbeitung der Gewebsblöcke geachtet, d.h. es wurden gleiche Chargen von Fixierungs- und Farblösungen benutzt, sowie gleiche Zeitabstände für die einzelnen Arbeitsgänge eingehalten.

Weitere Behandlung des Materials.

a) Lichtmikroskopie:

Einbettung in Paraplast, Schnittdicke 10 μm , modifizierte Trichromfärbung (ZIMMERMANN, 1967).

b) Elektronenmikroskopie:

Nach Glutaraldehydfixierung Auswaschen in Phosphatpuffer mit 0,22 m Saccharose. Nachfixierung: 1 %ige OsO_4 -Lösung (2 Std.). Einbettung: DURCUPAN (Fluka). Kontrastierung: Uranylacetat-Bleicitrat. Elektronenmikroskopische Aufnahmen: Elmiskop I (Siemens) bei einer Strahlenspannung von 60 kV.

3. Cytometrie

a) Lichtmikroskopie:

Punktzählverfahren (s. WEIBEL und ELIAS, 1967) mit dem Stichprobenmikroskop WILD (Heerbrugg).

Entsprechend der Klassifizierung von BRODMAN (Übersichts. ARIËNS KAPPERS, 1921) wurde die Schicht I. (Lamina zonalis) zur Untersuchung von gliareichen Neuropilstrukturen herangezogen, während die Schicht II. (Lamina granularis externa) dem Studium nervenzellreicher Hirnareale diente. Pro Tier wurden 100 Messungen der Kernfläche (A_N) bei 1250-facher Vergrößerung mit dem Punktzählverfahren (Rasterpunktstand

$d \approx 0,75 \mu\text{m}$) und 50 Bestimmungen der erythrozytengefüllten Kapillarlänge (L_{VC}) bei 290facher Vergrößerung durchgeführt. Der letztere Parameter wird durch Zählung der erythrozytengefüllten Kapillardurchtritte (P_A) durch die Meßfläche von $0,1225 \text{ mm}^2$ nach der Formel $L_{VC} = 2 P_A$ (mm/mm^3) errechnet. Die Kapillarlänge wird als Relativmaß für das durchblutete cerebrale Kapillarkompartiment angesehen (CRAIGIE, 1920). Um vergleichbare Werte zwischen Tieren aus verschiedenen Zeitintervallen zu erhalten, muß man ein standardisierbares Verfahren für die Kapillarlängenmessung anwenden. DIAMOND u.a. (1964) prüften Injektionsmethoden zur Gefäßdarstellung und die Anfärbung von Erythrozyten zur Markierung von durchbluteten Kapillaren, um funktionsbedingte Größenschwankungen des cerebralen Kapillarnetzes nachzuweisen; nur die Auszählung erythrozytengefüllter Kapillarquerschnitte führte zu reproduzierbaren Meßergebnissen. Gegen die Verwendung der letztgenannten Methode sprach bisher der unkontrollierte Blutverlust aus dem Kapillarnetz während der Gewebsentnahme. Jedoch schloß PICKWOTH (1934) aus seinen Untersuchungen, daß "on account of the microscopic size of capillaries, the mechanical force must be considerable before it causes a change in vascular relationships" (zit. nach DRUMMOND, 1944). Außerdem konnte intravital-mikroskopisch gesichert werden, daß beim Durchtrennen von Kapillaren die Endothelschnitttränder sofort miteinander verkleben, so daß kein Erythrozytenaustritt erfolgen kann (ILLIG, 1961). Die Eröffnung größerer Gefäße ließ sich auf ein Mindestmaß reduzieren, indem die Schnittführung für die Gewebsentnahme parallel zur Verlaufsrichtung der vom pialen Gefäßnetz senkrecht in die Tiefe der Rindenschicht abzweigenden Hauptgefäße gelegt wurde (vgl. COBB, 1932; KLOSOVSKII, 1963).

Auf die Berechnung von Absolutwerten aus den cytometrischen Daten wurde aus den obengenannten Gründen verzichtet. Außerdem reicht zur quantitativen Beschreibung der Zellreaktionen der Vergleich von Relativwerten

aufeinanderfolgender Zeitintervalle aus.

L_{Vc} - Kapillarlänge in der Ganglienzellschicht (Netzkapillaren ohne Vorzugsrichtung). Die Bestimmung der Kapillarlänge in der Schicht I ist an Frontalschnitten nicht möglich. Nach den Mitteilungen von KLOSOVSKII (1963) dringen beim Kaninchen arterielle Gefäße im Abstand von 280 - 440 μm senkrecht von dem pialen Gefäßnetz in die Rindenschichten des Parietalcortex vor, um hier Kapillarnetze aufzubauen. Durch die parallele Ausrichtung der Verbindungsgefäße zwischen extra- und intracerebralen Gefäßnetzen entsteht in der Schicht I. eine geordnete Gewebsstruktur mit Vorzugsrichtung. Eine Messung der Kapillarlänge sollte jedoch an Kapillaren ohne Vorzugsrichtung (z.B. Kapillarnetzen) durchgeführt werden, um aufwendige Korrekturverfahren zu umgehen (vgl. WEIBEL und ELIAS, 1967).

$A_{N_{ena}}$ - Kernfläche von Endothelzellen der Kapillaren im Neuropil der Schicht I. Es wurden nur längsgeschnittene Endothelzellkerne ausgewertet, deren Längsdurchmesser größer als der Querdurchmesser war. Diese Auswahl mußte getroffen werden, da Endothelzellkerne die Form triaxialer Ellipsoide besitzen. Die Berechnung absoluter Volumenwerte ist nicht sinnvoll, "since changes of nuclei of endothelial cells involve thickening or flattening, so that surface elongation may vary without any change in nuclear volume" (PAL-KOVITS und FISCHER, 1968). Die Angaben der Meßwerte in Flächeneinheiten reicht aus, um Änderungen der Kerngröße feststellen zu können.

$A_{N_{eni}}$ - Kernfläche von Endothelzellen der Kapillaren in der Schicht II.

$A_{N_{gi}}$ - Kernfläche von Gliazellen in Nervenzell-Glia-Komplexen der Schicht II. (Die angewandte Trichromfärbung erlaubt keine Unterscheidung zwischen Astro- und Oligodendrocyten).

A_{Ngm} - Kernfläche von Gliazellen der Schicht I. (Glia marginalis superficialis).

A_{Ngz} - Kernfläche von Ganglienzellen der Schicht II.

b) Elektronenmikroskopie:

Um geringgradige Änderungen der zellulären Bauelemente der "Blut-Hirn-Schranke" festzustellen, wurden folgende cytologische Parameter gemessen:

e/g - Verhältnis von Endothelzelldurchmesser zum Durchmesser der ersten Gliallamelle, die sich an die Basallamina der Kapillare anschmiegt. Die Quotientenbildung wurde gewählt, um Fehler zu umgehen, die durch Ausmessen von Profilschrägschnitten entstehen können (Abb. 1). Es wurden keine Kapillarlängsschnitte ausgewertet. Die Durchmesserbestimmung erfolgte senkrecht zur Basallamina nur in den kernfreien Abschnitten der Endothelzelle, die ohne Zwischenschaltung von Perizyten direkt den Glialamellen gegenüberliegen. 4 - 6 Doppelmessungen pro Kapillarquerschnitt wurden durchgeführt.

L_{mes} - Kürzester Abstand der Außenmembran von Endothelzell-Mitochondrien zur lumenseitigen Endothelzelloberfläche.

L_{meb} - Kürzester Abstand der Außenmembran von Endothelzell-Mitochondrien zur basalen Endothelzelloberfläche.

L_{mgb} - Kürzester Abstand der Außenmembran von Gliazell-Mitochondrien zur basalen, der Basallamina der Kapillare anliegenden Gliazelloberfläche.

D_{me} - größter Querdurchmesser zwischen den Außenmembranen von Endothelzell-Mitochondrien.

D_{mg} - größter Querdurchmesser zwischen den Außenmembranen von Gliazell-Mitochondrien.

Zur Bestimmung der Durchmesser von Glialamellen (Minimaldurchmesser im Parietalcortex des Kaninchens: Zwischen 100 - 200 Å; s. WOLFF, 1964) wurde eine 6600fache Ausgangsvergrößerung eingestellt. Nach Eichung mit dem Polaron grating replicon (LWU, München) mußte dieser Wert auf 6609 x korrigiert werden. Die Negative wurden auf einen Schirm mit 18facher Vergrößerung projiziert (Leitz, Wetzlar) und bei einer Endvergrößerung von 118962 (18 x 6609) ausgewertet.

Die cytometrischen Meßergebnisse wurden statistisch wie folgt überprüft (SACHS, 1972):¹

- a) Prüfung der Normalverteilung mit Wahrscheinlichkeitsnetz.
- b) Prüfung auf Unterschiede zwischen Varianz- und Mittelwertpaaren mit F- und t-Test (5 %-Niveau).
- c) Berechnung der Korrelationskoeffizienten aus den prozentualen Änderungen von Wertepaaren der untersuchten Parameter (Kontrollwert = 100 %) im 10, 30 und 60 min.-Intervall. Prüfung der Korrelationskoeffizienten auf Unterschiede gegenüber "0" (5 %-Niveau). Konstruktion von Graphen aus Korrelationskoeffizienten > 10,45%.

¹ Für großzügige Überlassung von Rechenzeiten danken wir Herrn Prof. Dr. F.W. KLUSSMANN und Herrn Dr. O. LUDWIG (William Kerckhoff-Institut der Max Planck-Gesellschaft, Bad Nauheim).

Befunde.

Als Funktionseinheit des Zentralnervensystems gilt der Nervenzell-Glia-Komplex (vgl. KUFFLER und NICHOLLS, 1966; HYDÉN, 1967). In Untersuchungen über das Reaktionsvermögen von Neuronen müssen deshalb Wechselbeziehungen zwischen Ganglien- und Gliazellen berücksichtigt werden. In den Rindenschichten I. bzw. II. finden sich Gliastrukturen an der Grenzfläche des Hirnkompartiments zum Liquorraum als Glia marginalis superficialis und am Ufer des Gefäßraums als Endfüße von Astrocyten. Außerdem sind Endothelzellen am Aufbau der "Blut-Hirn-Schranke" beteiligt. Das Zusammenspiel verschiedenartiger Zellelemente kann auf der Basis von Änderungen der Zellkerngröße und Kapillarlänge mittels Korrelationsanalyse und Konstruktion von Graphen verfolgt werden (ZIMMERMANN und PAUL, 1972). Dieses Verfahren soll auch an den Zellstrukturen der "Blut-Hirn-Schranke" angewandt werden. Im Modell des Kälteödems an der Großhirnrinde des Kaninchens ist es möglich, direkt durch Kälteeinwirkung geschädigte Zellelemente des linksseitigen Cortex im Vergleich zu reaktiv ansprechenden Nervenzell-Glia-Komplexen der korrespondierenden rechtsseitigen ("normalen") Cortex-Region zu studieren.

a) linksseitiger Cortex (Läsionszone)

Die lichtmikroskopischen cytometrischen Untersuchungen wurden getrennt an dem von marginalen Gliastrukturen beherrschten Neuropil der Schicht I. und an den von Glia Satelliten umgebenen Ganglienzellen der Schicht II. (BRODMAN, vgl. S. 82) durchgeführt. Da 24 Stunden nach der Kälteeinwirkung der traumatisierte Cortexbereich nekrotisch war, wurden die Messungen zu diesem Zeitpunkt abgebrochen. Für die Bestimmung der Kapillarlänge (L_{VC}) in Frontalschnittserien vom Parietalcortex gilt auch beim Kaninchen, daß die Besonderheiten

der Gefäßverzweigungen in den verschiedenen Rindenschichten berücksichtigt werden müssen. Durch die parallele Ausrichtung der Verbindungsgefäße zwischen pialen und intracerebralen Gefäßnetzen entsteht in der Schicht I. eine geordnete Gewebsstruktur mit Vorzugsrichtung (vgl. COBB, 1932; KLOSOVSKII, 1963). In Frontalschnitten sind nur Schichten mit Kapillarnetzbildung, d.h. die Ganglienzellschichten (z.B. Schicht II.), zur Auszählung von Kapillarquerschnitten geeignet (s.S.84). COBB (1932) errechnete für die motorische Rinde des Kaninchens eine Kapillarlänge von 515 mm/mm^3 . Die eigenen Meßwerte der Kapillarlänge in der Schicht II. des Parietalcortex von Kaninchen der Kontrollgruppe liegen bei 600 mm/mm^3 und stimmen somit gut mit den Ergebnissen von COBB (1932) überein. Die Kapillarlänge (L_{VC}) als Maß für die Gewebsdurchblutung unterliegt in der Schicht II. phasenhaften Schwankungen mit einem Maximalwert 30 min. nach Ödembeginn (vgl. Abb. 2a). Eine entsprechende zeitabhängige Größenänderung der Endothel-Zellkerne beobachtet man in den Schichten I. und II.: In der der Kälteeinwirkung am stärksten ausgesetzten Schicht I. tritt sofort eine Zunahme der Kernfläche von Endothelzellen auf, die zwar nach 60 min. zurückgeht, jedoch bis zum Zelluntergang über den Normwert erhöht bleibt. Die Kerne der Endothelzellen der Schicht II. reagieren ebenfalls im Intervall von 30 min. nach dem Experiment mit einer signifikanten Größenzunahme; diese erreicht jedoch 60 min. nach dem Versuchsbeginn wieder den Ausgangswert (vgl. Abb. 2 b mit c). Die am stärksten durch Kälte geschädigten Zellelemente gehören zur Glia marginalis superficialis (Schicht I.); ihre Kernfläche nimmt in den ersten 10 min. stark zu (50 %), um dann stetig abzufallen (Abb. 3). Diejenigen Gliazellen, die im Verband der Nervenzell-Glia-Komplexe der Schicht II. liegen, weisen - wie ihre

benachbarten Neurone - eine Kernvergrößerung im Zeitintervall von 0 - 30 min. auf; danach beobachtet man eine Abnahme der Kernflächen von Glia- und Ganglienzellen (vgl. Abb. 3 a mit b).

b) Rechtsseitiger Cortex (Kontrollbereich)

Das der Läsionszone entsprechende Cortexareal der rechten Hemisphäre bleibt über 24 Stunden funktionsfähig, frei von Zelluntergängen, jedoch treten Änderungen der gemessenen Parameter gegenüber den Ausgangswerten auf. In der Schicht II. beobachtet man 60 min. nach kontralateraler Kälteeinwirkung einen Rückgang der Kapillarlänge auf einen Minimalwert. Im anschließenden Zeitraum von 6 - 24 Stunden nimmt dieser Parameterwert in der rechtsseitigen Schicht II. wieder stark zu (Abb. 2 a). Demgegenüber reagieren die Endothelzellen der Schicht II. während der ersten 30 min. mit einer Kerngrößenzunahme von 30 % (Abb. 2 c), wogegen die Endothelzellen der Schicht I. keine signifikanten Kerngrößenänderungen aufweisen (Abb. 2 b). Die Zellen der Glia marginalis (Schicht I.) der rechten Cortex-Oberfläche reagieren auf die Schädigung des kontralateralen Hirngewebes (Abb. 3) mit einer 25 %igen Abnahme ihrer Kernfläche; sie unterscheiden sich dadurch von den Gliazellen, die im Verband mit den Neuronen in der Schicht II. vorkommen. Diese Gliazellen zeigen eine geringgradige, jedoch 60 min. nach Auslösung des Kälteödems signifikante Zunahme ihrer Kernfläche, die synchron mit der Kernvergrößerung der benachbarten Ganglienzellen verläuft (Abb. 4 a, b).

Um im Frühstadium des kälteinduzierten Hirnödems Funktionsstörungen der Blut-Hirn-Schranke nachzuweisen, wurden cytometrische Untersuchungen an elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus korrespondierenden linken und rechten Arealen der II. Rindenschicht 10 min. und 30 min. nach der Kältelesion durchgeführt. Die Quotientenwerte aus

Durchmesser des Endothelzellcytoplasmas zum Durchmesser der angrenzenden Gliallamelle lassen sich graphisch als zweigipfelige Kurve darstellen (Abb. 5 a). Bei den Kontrolltieren sind etwa 2/3 der Quotienten < 1 , während größere Quotienten nur in 1/3 der Fälle gefunden werden. Da erstere dann auftreten, wenn schmale endotheliale und breite gliöse Cytoplasmalamellen aneinandergrenzen (vgl. Abb. 1), stimmen diese Meßwerte gut mit den Ergebnissen von WOLFF (1963) über die Glia-Kapillarbeziehungen am Parietalcortex von Kaninchen überein. WOLFF (1963) fand perikapillär ebenfalls eine 2 : 1 Verteilung von breiten ($0,5 - 1 \mu\text{m}$) zu lamellären ($< 0,5 \mu\text{m}$) Astrozytenfortsätzen. Im 10 min.- und 30 min.-Intervall nimmt die Zahl der Quotientenwerte < 1 mit einem Maximum bei 0,2 in beiden Cortexhälften zu (Abb. 5 b,c); dies ist der Ausdruck einer zunehmenden Schwellung der perikapillären Astrozytenfortsätze. Gleichzeitig beobachtet man auf der zur Läsion kontralateralen Seite eine Vermehrung der Quotientenklasse 1 und 2 (Abb. 5 d,e); als Ursache kommt eine Volumenzunahme des Endothelzellcytoplasmas bei nur geringgradiger Durchmesseränderung der angrenzenden Gliallamelle in Frage. Diese unterschiedliche Auswirkung des zunehmenden Hirnödems auf das Cytoplasmavolumen von Endothel- und Gliazellen läßt sich am Verhalten der Mitochondrien beider Zelltypen weiter verfolgen.

Der maximale Mitochondriendurchmesser von Endothelzellen nimmt in der Läsionszone nach 10 min. stark zu, um nach dem 30 min.-Intervall wieder abzufallen (vgl. Abb. 6 b und c), jedoch liegt das Klassenmaximum - im Vergleich zu den Kontrolltieren - bei höheren Werten. Auch in den gegenseitigen Endothelzellen vergrößert sich der Mitochondriendurchmesser, allerdings gruppieren sich die Meßwerte im 10 min.-Intervall nicht um die extreme Größenklasse von 336 nm (vgl. Abb. 6 d und e). Die Cytometrie der Mitochondrien in den perikapillären Gliafortsätzen der Läsionszone ist im 30 min.-Intervall schwierig,

da ihre Identifizierung infolge einer massiven Schwellung und einer Zerstörung von Cristae nicht immer gelingt; die Verteilungskurve muß daher unvollständig bleiben. Aus diesem Grunde können in diesem Zeitabschnitt nur Daten aus kontralateralen rechtsseitigen Cortexabschnitten mit den Kontrollwerten verglichen werden. 10 min. nach Versuchsbeginn vergrößert sich der mittlere Mitochondriendurchmesser sowohl in rechts - als auch in linksseitigen perikapillären Gliazellen (vgl. Abb. 7 a mit b, c). Diese Schwellung ist im rechtsseitigen Cortexareale noch nach 30 min. zu beobachten (Abb. 7 d).

Betrachtet man die intrazelluläre Verteilung der Mitochondrien als einen weiteren cytologischen Parameter zur Beurteilung der Zellfunktion (vgl. OKSCHE u.a., 1972), so zeigt sich, daß mit der Ausbreitung des kälteinduzierten Hirnödems die Abstände zwischen der äußeren Mitochondrienmembran und der Zelloberfläche zunehmen (Abb. 8,9,10). Während in den Endothelzellen der Kontrolltiere die minimale Diffusionsstrecke zwischen Mitochondrien und lumenseitiger Zelloberfläche meist bei 42 nm liegt, beobachtet man im 10 min.- und 30 min.-Intervall in beiden Hirnhälften (Abb. 8) Mittelwerte von 84 nm. Hierzu parallel vergrößert sich im gleichen Zeitraum der Abstand zwischen Endothel-Mitochondrien und der Basallamina sowohl in Kapillaren des Läsionsgebiets als auch der korrespondierenden kontralateralen Rindenzone (Abb. 9). Die Auswirkung der Schwellung von perikapillären Gliafortsätzen auf die Verteilung der gliösen Mitochondrien zeigt sich im rechtsseitigen Cortex erst nach 30 min. an einer Vergrößerung des minimalen Abstands zwischen Glia-Mitochondrien und der kapillären Basallamina (vgl. Abb. 10 a mit d). In diesem Intervall ließen sich die entsprechenden Mitochondrien der Läsionszone nicht analysieren (s.o.).

Die quantitativen elektronenmikroskopischen Befunde bestätigen die

Ergebnisse der Kerngrößenmessung an Endothel- und Gliazellen, die eine Beteiligung dieser beiden Zelltypen in Frühstadien des Hirnödems (bis zu 30 min. nach Kälteläsion) demonstrieren. Neben der Reaktion im Läsionsbereich beobachtet man auch im korrespondierenden rechtsseitigen Areal der II. Rindenschicht eine Verlängerung der Austauschstrecke zwischen Glia- bzw. Endothel-Mitochondrien und der Basallamina von Kapillaren.

Den cytometrischen Ergebnissen sollen nun Befunde aus Untersuchungen der Blutgerinnung in verschiedenen Phasen des kälteinduzierten Hirnödems gegenübergestellt werden. Zunächst fällt auf, daß beim Kaninchen die Zerstörung des postzentralen, parietalen Cortex einer Hemisphäre unerwartet geringe Auswirkungen auf das lokale intrakranielle Hämostasepotential hat. Trotzdem sind phasenhafte Aktivitätsänderungen des Gerinnungssystems abgrenzbar, die sich mit bestimmten morphologisch registrierbaren Stadien der Ödementwicklung korrelieren lassen (s. Diskussion S.95). Eigenartigerweise werden die intracerebralen Gerinnungsveränderungen von einer hypokoagulablen Phase (Zeitintervall von 10 - 30 min. nach Kälteläsion) eingeleitet: r- und k-Zeiten des TEG sind verlängert (Abb. 11). Hiermit stimmen die Abnahme des Quickwertes um 20 % (Abb. 12) und die Minderung der Aktivität von Faktor V (Abb. 13) überein. Während der ersten 30 min. bleiben die im rechten Herzen gemessenen Werte stabil. Zwischen 60 und 360 min. zeichnet sich in der peripheren Gefäßstrombahn der Übergang in eine Phase der Hyperkoagulabilität ab: Die k-Zeit wird deutlich verkürzt, die maximale Breite des TEG nimmt gegenüber dem Kontrollwert zu und die Aktivität des Faktors V liegt im oberen Normbereich (60 min.-Wert). Fibrinogen-Konzentration und Thrombozytenzahl geben keine zuverlässige Auskunft über die vermutete gesteigerte Gerinnungsbereitschaft; dies beruht auf der schon normalerweise hohen Streubreite der beiden letztgenannten Komponenten des Gerin-

nungssystems. Der Übergang in die folgende hypokoagulable Phase ist am Abfall des Quick-Wertes und der verminderten Aktivität von Faktor V 6 Stunden nach Beginn des Experiments erkennbar. Beachtet man den phasenhaften Ablauf einer Verbrauchskoagulopathie (LASCH u.a., 1961), so rechtfertigen die nach 12 Stunden gewonnenen Gerinnungsdaten die Annahme eines Stadiums der Hypokoagulabilität. 12 Stunden nach Ödemeinleitung sind vor allem extracerebral die r- und k-Zeiten verlängert. Hierzu paßt die im extrakraniellen Blutstrom beobachtete Tendenz der allmählichen Reduktion der Thrombozytenzahl (Abb. 14).

Auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man, daß 10 min. nach der Kälteeinwirkung auf der lädierten (linken) Cortexseite vereinzelte Thrombozyten im Kapillarlumen anzutreffen sind (Abb. 15a). Nach 30 min. nehmen Thrombozyten in den Kapillaren der Läsionszone Kontakt mit den vermehrt auftretenden leistenförmigen endothelialen Ausstülpungen auf (Abb. 15 b). Intra- und extrakapilläre Fibrinpräzipitate (sichtbar an ihrer Querstreifung mit einer Periodenlänge von $230 - 240 \text{ \AA}$) erscheinen erst im kortikalen Nekrosegebiet, nachdem im extrakraniellen Gefäßkompartiment Anzeichen eines Hämostasedefektes erkennbar sind (Abb. 15 c, d).

Zusammenfassend stellen wir fest, daß im Verlauf eines kälteinduzierten Hirnödems das Hämostasepotential durch lokale Störung der Gefäßpermeabilität verändert wird. Innerhalb der ersten 30 min. nach Kälteapplikation beobachtet man eine initiale Phase der Hypokoagulabilität nur im Stromgebiet der Vena facialis posterior, während die darauffolgenden Stadien einer Verbrauchskoagulopathie (zunächst Hyper- dann Hypokoagulabilität) stärker im extrakraniellen Gefäßkompartiment ausgeprägt sind. Für eine eindeutige Klärung der beobachteten Gerinnungsveränderungen reicht die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe nicht aus, vor allem fehlt noch eine abschließende Über-

prüfung des Fibrinolysesystems; diese Frage soll in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Diskussion²

Obwohl das Hirnvolumen cytologisch nur in drei wesentliche Kompartimente - Neuronen-, Glia- und Endothelzellraum - unterteilt werden kann, fehlen quantitative Angaben über die zeitabhängige Änderung der Kompartimentanteile im Verlauf der Ödementwicklung. Die Vergrößerung des perivaskulären Astrozytenraumes im Cortex wurde beim Kälteödem von TORACK u.a. (1959) beschrieben. KLATZO (1967) wies die Aufnahme von Serumproteinen (hauptsächlich Albumin) durch Astrozyten nach. Im Gegensatz zu der vorwiegend intrazellulären Flüssigkeitseinlagerung im Rindenbereich fanden LEE und BAKAY (1966) eine Vergrößerung des Extrazellulärtraumes im Mark der durch Kälteapplikation direkt geschädigten Hemisphäre. Die unterschiedliche Ausbreitung der Ödemflüssigkeit in Rinde und Mark deutet auf weitere Faktoren der Ödementwicklung hin, die sich nicht aus der morphologisch sichtbaren einförmigen Reaktion von Nervenzell- Glia-Komplexen (Volumenvergrößerung) ableiten lassen. Mit biochemischen Analysemethoden zeigten REULEN u.a. (1970), daß Elektrolyt- und Wasserverschiebungen Folge der gestörten Produktion energiereicher Verbindungen - ATP und Kreatinphosphat - sind. Da die Volumenvergrößerung des Gehirns zur Verdrängung des Gefäßkompartiments führt, rückt im weiteren Verlauf des Ödems eine andere Eigenschaft des Hirngewebes in den Vordergrund: die Unfähigkeit, seinen infolge Anoxie verminderten Nukleotid-Pool durch Neusynthese zu komplettieren (GER-

² Herrn Prof. Dr. F. ERBSLÖH, Zentrum für Neurologie, Herrn Prof. Dr. Dr. H.HAGER, Institut für Neuropathologie, Herrn Prof. Dr. H.-G. LASCH, Zentrum für Innere Medizin und Herrn Prof. Dr. H.W. PIA, Neurochirurgische Klinik der Universität Gießen, danken wir für die Diskussion der Befunde.

LACH u.a., 1970). Außerdem haben BINGHAM u.a. (1969, 1971) auf die Bedeutung lysosomaler Enzyme beim Fortschreiten des Hirnödems hingewiesen. BINGHAM u.a. (1969) beobachteten bei Ratten im Zeitraum von 12 Stunden nach extraduraler Kohlensäureschnee-Applikation Aktivitätsabnahmen von saurer β -Glycerophosphatase und saurem Kathepsin, sowie eine Aktivitätszunahme von β -Glucuronidase; sie argumentieren: "that the production of edema about an area of injury might be due to the action of these enzymes (cathepsins) on the local capillary bed with a consequent increase in vascular permeability. The action of proteases might be on the structural proteins of the astrocytic glial foot plate, the capillaries themselves, or both. Hydrolases might also affect blood constituents such as platelets resulting in the release of permeability factors".

Neben der Einschwemmung proteolytischer Enzyme in die Blutbahn dürfen folgende Faktoren das hämostatische Gleichgewicht im Gebiet der Hirngewebsnekrose und des perifokalen Ödems stören: 1) Aus der Nekrosezone dringt thromboplastisches Material in das Gefäßsystem ein. 2) Gewebsazidose und Mikrozirkulationsstörungen (Strömungsverlangsamung, Stase) stehen in enger Wechselbeziehung zueinander und dehnen sich von der direkt kältegeschädigten Zone auf benachbarte Hirnabschnitte aus. Die Gerinnungsbereitschaft steigt durch Verlangsamung der Kapillarperfusion und Einstrom saurer Stoffwechselprodukte in das Kapillarbett (Übersicht s. HARDWAY, 1970).

Die für das kälteinduzierte Hirnödem postulierten Wechselbeziehungen zwischen Gerinnungssystem und gefäßabhängigen Gewebsarealen werden durch unsere Untersuchungen beim Kaninchen belegt. Die Bestimmungen des Hämostasepotentials im Zeitintervall von 10 - 30 min. nach Kälteapplikation erbrachten den Nachweis einer nur intrakraniell verminderten Gerinnungsbereitschaft (s. S. 92). Will man diese Störung des Gerinnungssystems im Sinne einer Verbrauchskoagulopathie (LASCH u.a., 1961) deuten, so müßte der Phase der beobachteten Hypokoagulabilität ein Stadium gesteigerter Gerinnungsbereitschaft, gekennzeichnet durch intravasale Thrombo-

zytenaggregation und Fibrinniederschläge, vorangegangen sein. Die Suche nach entsprechenden morphologischen Kriterien ergibt, daß im 10 min.-Intervall nach dem Experiment auf der lädierten (linken) Seite vereinzelt Thrombozyten im Kapillarlumen anzutreffen sind (Abb. 15 a). Auch 30 min. nach Kälteläsion beobachtet man in den Kapillaren der Läsionszone Thrombozyten lediglich zwischen vermehrt auftretenden leistenförmigen endothelialen Ausstülpungen (Abb. 15 b). Erst nachdem auch im extrakraniellen Gefäßkompartiment Anzeichen eines Hämostasedefektes erkennbar sind, treten intra- und extrakapillär massiv Fibrinpräzipitate auf (Abb. 15 c,d). Möglicherweise reichen die hohen Konzentrationen von Plasminogenaktivator im Hirngewebe (s. KRAUS, 1969) und in Endothelzellen (TODD, 1959, WARREN, 1964) zunächst aus, um die Ablagerung von Fibrin im Intrakranialraum zu verhindern. Der fortschreitende, ödembedingte Zelluntergang und die Ausdehnung des Gerinnungsdefektes auf das extrakranielle Gefäßgebiet führen schließlich zum Zusammenbruch der lokalen Abräummechanismen im Bereich des aktivierten Gefäßbindegewebsapparates.

Durch Messung von Kernfläche und Kapillarlänge ist die unterschiedliche Reaktion der Funktionseinheiten: 1) Endothel-Neuron-Glia-Komplex (II. Rindenschicht) und 2) Glia marginalis (I. Rindenschicht) erkennbar. Im Neuropil der Schicht I. fällt in der linken Hemisphäre eine ausgeprägte, wahrscheinlich durch direkte Kälteschädigung der Kernmembran bedingte, passive Größenzunahme von Endothelzellkernen auf, während in der korrespondierenden Region der Gegenseite nur eine mäßige, protrahierte Vergrößerung von Endothelzellkernen vorkommt (vgl. Abb. 2). Im Vergleich zu diesen Befunden sind die Reaktionen der Glia marginalis superficialis heftiger. Die marginale Glia im Bereich der Kälteeinwirkung zeigt zunächst eine ausgeprägte Kernschwellung, die später in Kernpyknose übergeht und ebenfalls Ausdruck einer direkten kältebedingten Kernmembranschädigung sein dürfte. Demgegenüber läßt sich die kontralateral gemessene Abnahme der Kernfläche von rund 25 % nicht zufriedenstellend beantworten (Abb. 3).

Endgültige Angaben werden erst nach einer cytometrischen Analyse der marginalen Glia in elektronenmikroskopischen Aufnahmen möglich sein.

Die cytometrisch festgestellte Abnahme des erythrozytenhaltigen Kapillaranteils in der Schicht II. beider Hirnhälften steht im Einklang mit der von **POTCHEN u.a. (1971)** beim Hirnödem gemessenen Verminderung des cerebralen Erythrozyten-Raumes. **BRUCE u.a. (1972)** beobachteten am kälteinduzierten Hirnödem des Occipitalcortex von Affen "significant decreases in regional cerebral blood flow in the perilesion area and in the homologous area of the contralateral hemisphere". Da nach **BAKAY und LEE (1965)** die Kälteläsion als Modell des Hirninfarktes gilt, sollten zur Interpretation der eigenen Befunde weitere Mitteilungen über Auswirkungen des einseitigen Hirninfarktes auf die Funktion der Gegenhemisphäre herangezogen werden. Erstmals konnten **HOEDT-RASMUSSEN und SKINHØJ (1964)** durch seitengetrennte Messung der Hirndurchblutung bei Patienten mit einseitigem Hirninfarkt auch kontralateral eine Durchblutungs-minderung nachweisen. **MEYER u.a. (1970)** kombinierten Durchblutungsmessungen mit Stoffwechseluntersuchungen in infarzierter und "gesunder" Hemisphäre. Diese Arbeitsgruppe fand eine bilaterale Abnahme der Hirndurchblutung und des Hirnmetabolismus. Die Ausbreitung der lokal im Infarktgebiet ausgelösten Durchblutungs- und Stoffwechselstörungen auf die Gegenseite soll über interhemisphärische und corticospinale Projektionsbahnen verlaufen (**VON MONAKOV, 1914**). **KEMPINSKY (1958)** berichtete, daß im Tierexperiment nach Bal-kendurchtrennung ein einseitiger Verschuß der Arteria cerebri media keine Auswirkung auf die Durchblutung der kontralateralen Hemisphäre hat. Andererseits beobachteten **MEYER u.a. (1970)** an Patienten mit Hirnstammläsion eine doppel-seitige Abnahme der corticalen Durchblutung.

Den Kerngrößenzunahmen in den Endothel-, Nerven- und Gliazellen des Läsionsbereichs stehen geringgradige, jedoch signifikante Vergrößerungen der Kerne von Endothel-, Nerven- und Gliazellen in der korrespondieren-

den kontralateralen Region der II. Rindenschicht gegenüber. Um die geschilderten Kerngrößenänderungen interpretieren zu können, sind weitere cytologische Parameter, die Informationen über den Funktionszustand von Zellen liefern (Mitochondriendurchmesser, Mitochondrienabstand von Zelloberflächen), zu berücksichtigen. Die Schwankungen des Hydrationszustandes von Zellkernen können einerseits funktionsbedingt sein und unter physiologischer Stimulation auftreten (BENNINGHOFF, 1950), andererseits gilt die nucleäre Flüssigkeitseinlagerung als Zeichen eines pathologischen Prozesses (Übersicht s. HAGER, 1968). Während die Schwellungen von Glia- und Ganglienzellkernen sowie von Astrogliafortsätzen in der Läsionszone des kälteinduzierten Hirnödems bekannt sind (vgl. TORACK u.a., 1959); LEE und BAKAY, 1966), liegen noch keine elektronenmikroskopisch-cytophotometrischen Untersuchungen über die Reaktionskinetik von Endothel-, Glia- und Ganglienzellen in korrespondierenden Arealen des direkt geschädigten Hirngewebes und der kontralateralen Hemisphäre vor. Die eigenen cytophotometrischen Befunde am elektronenmikroskopischen Material bestätigen, daß die Kerngrößenänderungen von Endothel- und Gliazellen beider Hemisphären Ausdruck zellulärer, ödembedingter Funktionsänderungen sind. Zunächst geht aus den Durchmesserwerten von Endothelzellcytoplasma und angrenzender Glialamelle hervor, daß auch in dem zur Ödemzone kontralateralen Rindenbereich Volumenzunahmen der Zellelemente, die am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, auftreten (vgl. Abb. 5). Die Verlängerung der Austauschstrecke zwischen den verschiedenen Hirnkompartimenten zeigt sich an einer Vergrößerung des Abstandes der Glia- bzw. Endothel-Mitochondrien von der kapillären Basallamina (vgl. Abb. 8,9,10). Die Beeinträchtigung der Mitochondrien erkennt man an der Volumenvergrößerung dieser Organellen in Endothel- und Gliazellen der untersuchten beiderseitigen Cortexareale (vgl. Abb. 6,7).

Eine Beurteilung der Wechselbeziehungen zwischen den Zellelementen einer Hemisphäre und denen der Gegenseite ist weiterhin durch Berech-

nung der Korrelationskoeffizienten aus den gemessenen Parameteränderungen möglich. Die Korrelationen werden in Graphen zusammengefaßt. Aus der Summe der in einem Punkt beginnenden bzw. endenden Kanten (signifikante Korrelationen) kann der Verknüpfungsgrad und somit die Bedeutung des Punktes im Gesamtsystem abgeleitet werden (Näheres s. ZIMMERMANN und PAUL, 1972). Die Punkte repräsentieren die Änderungen der cytometrisch ermittelten Parameter.

Im initialen Zeitintervall des Kälteödems (0 - 10 min.; Abb. 16 a) wird die besondere Stellung des Gefäßsystems deutlich. Kernvergrößerungen im Kapillarendothel der I. und II. Rindenschicht zeichnen sich beide durch den höchsten Verknüpfungsgrad ($g = 3$) gegenüber der Kernreaktion der Glia marginalis superficialis (I. Schicht) und der Gliazellen im Verband der Nervenzell-Glia-Komplexe (II. Schicht) aus. Außerdem erkennt man, daß während der ersten 10 min. nach Einwirkung von flüssigem Stickstoff auf das linke Os parietale signifikante Korrelationen nur zwischen Zellelementen bestehen, die am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke bzw. der Liquor-Hirn-Begrenzung beteiligt sind und in der direkten Kälteschädigungszone liegen.

Demgegenüber lassen sich 30 min. nach Versuchsbeginn hohe Korrelationen auch zwischen Änderungen der cytometrischen Parameter des Gefäßkompartiments korrespondierender links- und rechtsseitiger Rindenschichten errechnen (Abb. 16 b). Lineare Abhängigkeiten existieren zwischen der Größenzunahme der Endothelkerne in der II. Rindenschicht des rechtsseitigen Cortex-Areals und den Kerngrößenänderungen von Endothelzellen und den Neuronen des entsprechenden linksseitigen Cortex-Areals. Gleichhohe Verknüpfungsgrade ($g = 3$) können den Kerngrößenänderungen der linksseitigen Neuron-Glia-Komplexe zugeordnet werden.

60 min. nach der Kälteapplikation zeigen die hohen Werte der Korrelationskoeffizienten aus Kerngrößenänderungen von Nervenzell-Glia-Komplexen der linksseitigen Schicht und der Abnahme der Kapillarlänge in der ent-

sprechenden rechtsseitigen II. Schicht, der Kerngrößenänderung von Endothelzellen in der linksseitigen Cortexschicht und rechtsseitigen Gliazellen der I. Schicht sowie von linksseitigen Neuronen und rechtsseitigen der II. Schicht, daß von dem Ödemzustand in der linken Hemisphäre ein zunehmend stärkerer Einfluß auch auf die Zellelemente der Gegenseite ausgeht (Abb. 16 c). Die Schrankenstörung des Gefäßkompartiments, ablesbar an der Vergrößerung der Endothelkerne im linksseitigen Cortex-Areal ($A_{N\text{ end I}}$), verläuft parallel mit der Kerngrößenänderung der Ganglienzellen in der rechtsseitigen II. Rindenschicht ($r = 0,92$). Wiederum fallen die hohen Verknüpfungsgrade der gemessenen Größen des Gefäßkompartiments auf. Sie sind Indikatoren dafür, daß das Gefäßsystem wesentliche Regulationsaufgaben im Verlauf des Hirnödems übernimmt. Die alterierte Funktion des Gefäßsystems beeinflusst sowohl das Verhalten der Zellelemente des traumatisierten ödematösen Bereichs als auch das der nicht direkt geschädigten kontralateralen Hemisphäre.

Außerdem muß an eine direkte Wechselwirkung zwischen dem intrakraniellen Gefäßkompartiment und der extrakraniellen peripheren Gefäßstrombahn gedacht werden. Ein Hinweis darauf ist das zunächst nach 60 min. erhöhte, später verminderte Hämostasepotential, das sowohl intra- als auch extrakraniell beobachtet wird. Andererseits kann eine indirekte druckbedingte Beeinflussung des Gerinnungssystems über Aktivierung bzw. Inaktivierung zentralnervöser Regulationszentren der Hämostase nicht ausgeschlossen werden. LANDABURU u.a. (1971) wiesen im vorderen Hypothalamus von Ratten einen Faktor nach, der die Freisetzung eines Peptids aus dem Hypophysenvorderlappen bewirkt (sog. "liver trophine", das nicht mit ACTH identisch sein soll) und über die Leber zur Steigerung der Fibrinogen- und Prothrombinsynthese führt. Niedrige Dosen von ACTH sollen demgegenüber Hypocoagulabilität bewirken. Der Einfluß des peripheren Nervensystems auf die Blutgerinnung, vor allem in Streßsituationen, ist durch die elektrophysiologischen Untersuchungen von CANNON und GRAY (1914) an den Nn. splan-

nici der Katze bekannt. Diese Autoren wiesen als wirksames Prinzip des beobachteten Hämostasedefektes Adrenalinfreisetzung nach. Ein normales Gerinnungspotential hängt demnach von lokalen Austauschvorgängen zwischen Gefäßwand und -inhalt ab, in die zentralnervöse, humoral gesteuerte Regulationsprozesse eingreifen können. Die im vorliegenden Ödemmodell ausgelöste umschriebene Permeabilitätsstörung in der kältegeschädigten (linken) Hemisphäre erfaßt das Gefäßsystem und verändert dadurch lokal das Hämostasepotential.

L i t e r a t u r

- BAKAY, L., HAQUE, I.U.: Morphological and chemical studies in cerebral edema. I. Cold induced edema. J. Neuropath. Exp. Neurol. 23, 393 - 428 (1964).
- , LEE, J.C.: Cerebral edema, Springfield:Ch. C. Thomas, 1965.
- BENNINGHOFF, A.: Funktionelle Kernschwellung und Kernschrumpfung. Anat. Nachr. 1, 50 - 52 (1950).
- BINGHAM, W.G., PAUL, S.E., SASTRY, K.S.S.: Effects of cold injury on six enzymes in rat brain. Arch. Neurol. 21, 649 - 660 (1969).
- , PAUL, S.E., SASTRY, K.S.S.: Effect of steroid on enzyme response to cold injury in rat brain. Neurology 21, 111 - 121 (1971).
- BRUCE, D.A., VAPALAHTI, M., SCHUTZ, H., LANGFITT, T.W.: rCBF, CMRO₂ and the intracranial pressures following a local cold injury of the cortex. pp 85 - 89. In: Intracranial pressure (M. BOCK and H. DIETZ). Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1972.
- CANNON, W.B., GRAY, H.: Factors affecting the coagulation by adrenalin injection. Am. J. Physiol. 34, 232 - 242 (1914).
- CLASEN, R.A., BROWN, O.V.L., LEAVITT, S., HASS, G.M.: The production by liquid nitrogen of acute closed cerebral lesions. Surg. Gynec. Obstet. 96, 605 - 616 (1953).
- COBB, S.: Cerebrospinal blood vessels. In: W. PENFIELD (ed.), Cytology and cellular pathology of the nervous System, Vol. II, W. pp. 518 - 610. New York: P.B. Hoeber, Inc. 1932.
- CRAIGIE, E.H.: On the relative vascularity of various parts of the central nervous system of the albino rat. J. comp. Neurol. 31, 429 - 464 (1920).
- DIAMOND, M.C., KRECH, D., ROSENZWEIG, M.R.: The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. J. comp. Neurol. 123, 111 - 120 (1964).
- DRUMMOND, S.P.: A comparison of the injection and red-cell staining methods used in quantitative studies of the capillaries of the central nervous system. Anat. Rec. 89, 93 - 106 (1944).
- FEISSLY, R., LÜDIN, H.: Microscopie par contrastes de phase (III. Applications à l'hématologie). Rev. Hémat. 4, 481 (1949).

- GÄNSHIRT, H.: Die Sauerstoffversorgung des Gehirns und ihre Störung bei der Liquordrucksteigerung und beim Hirnödem. In: MÜLLER, M., SPATZ, H., VOGEL, P. (eds.), Monographien aus dem Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie, H. 81, Berlin: Springer, 1957.
- GERLACH, E., MARKO, P., ZIMMER, H.-G., PECHAN, I., TRENDLENBURG, Ch.: Different response of adenine nucleoside synthesis de novo in kidney and brain during aerobic recovery from anoxia and ischemia. *Experientia* 27, 876 - 878 (1970).
- HAGER, H.: Allgemeine morphologische Pathologie des Nervengewebes. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1968.
- HARDAWAY, R.M.: Hemodynamic compensation as therapy of microcirculatory disturbance. In: Microcirculation, Hemostasis and Shock, Symposium, Schloß Reinhartshausen / Rhein, October 3rd/4th 1969. (Eds. LASCH, H.-G., HEENE, D.L.) pp. 135 - 140. Stuttgart - New York: Schattauer, 1970.
- HARTERT, H.: Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin. Wschr.* 26, 577 - 583 (1948).
- HOEDT-RASMUSSEN, K., SKINHØJ, E.: Transneuronal depression of the cerebral hemispheric metabolism in man. *Acta Neurol. Scand.* 40, 41 - 46 (1964).
- HYDEN, H.: The neuron. Amsterdam - London - New York: Elsevier, 1967.
- ISHII, S., HAYNER, R., KELLY, W.A., EVANS, J.P.: Studies of cerebral swelling. II. Experimental cerebral swelling produced by supratentorial extradural compression. *J. Neurosurg.* 16, 152 - 166 (1959).
- ILLIG, L.: Die terminale Strombahn. pp. 166 - 167. Berlin - Göttingen - Heidelberg: Springer, 1961.
- KAPPERS, ARIËNS, C.U.: Die vergleichende Anatomie des Nervensystems der Wirbeltiere und des Menschen. II. Abschn.: Vergleichende Anatomie des Kleinhirns, des Mittel- und Zwischenhirns und des Vorderhirns pp. 1118 - 1255. Haarlem: De Erven F. Bohn, 1921.
- KEMPINSKY, W.H.: Experimental study of distant effects of acute focal brain injury: a study of diaschisis. *Arch. Neurol. Psychiat.* 79, 376 - 389 (1958).
- KLATZO, I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 26, 1 - 14 (1967).
- , PIRAUX, A., LASKOWSKI, E.J.: The relationship between edema, blood brain barrier and tissue elements in a focal brain injury. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 17, 548 - 564 (1958).

- KLOSOVSKII, B.N.: Blood circulation in the brain. pp. 78 - 79. Jerusalem: Israel Program Scientific Translations, 1963.
- KRAUS, H.: Probleme der Blutgerinnungsstörungen in der Neurochirurgie. *Acta Neurochir.* 20, 123 - 130 (1969).
- KUFFLER, S.W., NICHOLLS, J.G.: The physiology of neuroglial cells. *Erg. Physiol.* 57, 1 - 90 (1966).
- LANDABURU, R.H., CASTELLANOS, D.E., GIAVEDONI, E., LO PRESTI, C.A.: Neurohumoral control of blood coagulation. II. Participation of hypothalamus and hypophysis. *Acta physiol. Latinoam.* 21, 74 - 80 (1971).
- LASCH, H.-G., RODRIGUEZ-ERDMANN, F., SCHÜTTERLE, G., SESSNER, H.H. Verbrauchskoagulopathie. *Folia haemat. (Frankfurt)* N.F., 6, 325 (1961).
- LEE, J.C., BAKAY, L.: Ultrastructural changes in the edematous central nervous system. II. Cold induced edema. *Arch. Neurol.* 14, 36 - 49 (1966).
- MEYER, J.S., SHINOHARA, Y., KANDA, T., FUKUUCHI, Y., ERICSSON, A.D., KOK, N.K.: Diachisis resulting from acute unilateral cerebral infarction - quantitative evidence for man. *Arc h. Neurol.* 23, 241 - 247 (1970).
- MONAKOW von, C.: Die Lokalisation im Großhirn und der Abbau der Funktion durch kortikale Herde. pp. 26 - 34. Wiesbaden; Bergmann, 1914.
- OKSCHE, A., ZIMMERMANN, P., OEHMKE, H.-J.: Morphometric studies of tubero - eminential systems controlling reproductive functions. In: *Brain - Endocrine Interaction. Median Eminence: Structure and Function.* Int. Symp. Munich 1971. pp. 142 - 153, Basel: Karger, 1972.
- OPITZ, E., SCHNEIDER, M.: Über die Sauerstoffversorgung des Gehirns und den Mechanismus von Mangelwirkungen. *Ergebn. Physiol.* 46, 126 - 260 (1950).
- PALKOVITS, M., FISCHER, J.: Karyometric investigations. Budapest: Akadémia Kiadó, 1968.
- PICKWORTH, F.A.: A new method of study of the brain capillaries and its application to the regional localization of mental disorders. *J. Anat.* 69, 62 (1934).
- POTCHEN, E.J., ADATEPE, M.H., PENKOSKE, M., PENKOSKE, P., PEREZ, C.: Radioisotopic assessment of cerebral edema. *Arch. Neurol.* 24, 287 - 290 (1971).
- QUICK, A.J.: The coagulation defect in sweet clover disease in the hemorrhagic chick of dietary origin. A consideration of the source of prothrombin. *Amer. J. Physiol.* 118, 260 - 283 (1937).

- RATNOFF, O.D., MENZIE, C.: A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J. Lab. Clin. Med.* 316 (1951).
- REULEN, H.J., STEUDE, U., BRENDDEL, W., HILBER, C., PRUSINER, S.: Energetische Störung des Kationentransports als Ursache des intrazellulären Hirnödems. *Acta Neurochir.* 22, 129 - 166 (1970).
- RYDER, H.W., ESPEY, F.F., KIMBALL, F.D., PENKA, E.J., ROSEN-AUER, A., PODOLSKY, B., EVANS, J.P.: The mechanism of the change in the volume of the fluid space. *J. Lab. Clin. Med.* 41, 428 - 435 (1953).
- SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1972.
- SAWYER, P.N., SRINIVASAN, S.: Dependence of thrombosis on the electrochemical characteristics of the blood vessel wall, blood cells and prosthetic materials. 5th Europ. Conf. Microcirculation, Gothenburg 1968. *Bibl. anat.* 10, 405 - 417 (1969).
- SCHOLZ, W.: Histologische und topische Veränderungen und Vulnerabilitätsverhältnisse im menschlichen Gehirn bei Sauerstoffmangel, Ödem und plasmatische Infiltrationen. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* 181, 621 - 665 (1949).
- SCHRÖER, H., HAUCK, G.: Influence of the blood clotting potential on the barrier function of the vessel wall. 5th Europ. Conf. Microcirculation Gothenburg, 1968. *Bibl. anat.* 10, 418 - 423 (1969).
- SCHULTZE, H.E., SCHWICK, G.: Die klinische Bedeutung der differenzierten Bestimmung von Prothrombin und seiner Acceleratoren der Blutgerinnung (I und II). *Medizinische*, 1354 u. 1386 (1953).
- TODD, A.S.: The histological localization of fibrin olysine activator. *J. Path. Bact.* 78, 281 - 294 (1959).
- TORACK, R.M., TERRY, R.D., ZIMMERMAN, H.M.: The fine structure of cerebral fluid accumulation. I. Swelling secondary to cold injury. *Am. J. Path.* 35, 1135 - 1147 (1959).
- WARREN, B.A.: Fibrinolytic activity of vascular endothelium. *Brit. med. Bull.* 20, 213 - 216 (1964).
- WEIBEL, E.R., ELIAS, H.: Quantitative methods in morphology. Berlin-Heidelberg - New York: Springer, 1967.
- WOLFF, J.: Beiträge zur Ultrastruktur der Kapillaren in der normalen Großhirnrinde. *Z. Zellforsch.* 60, 409 - 431 (1963).
- : Über die Möglichkeit der Kapillarverengung im Zentralnervensystem. Eine elektronenmikroskopische Studie an der Großhirnrinde des Kaninchens. *Z. Zellforsch.* 63, 593 - 611 (1964).

YOUNG, J.Z.: The life of mammals. Oxford at the Carendon Press, 1970.

ZIMMERMANN, P.: Methodische Modifikationen und eine neue Technik zur Darstellung des neurosekretorischen Apparates und der Neuroglia bei Wirbellosen (Lumbricus terrestris L.). Z. wiss. Mikr. 68, 154 - 162 (1967).

-----, PAUL, E.: Reaktionsmuster verschiedener Mittel- und Zwischenhirnzentren nach Unterbrechung der Nervenbahnen des Pinealkomplexes von Rana temporaria. Z. Zellforsch. 128, 512 - 537 (1972).

Dr. P. Zimmermann

Zentrum für Anatomie und Cytobiologie
Justus Liebig-Universität

6300 GIESSEN

Friedrichstr. 24

Bundesrepublik Deutschland

Abb. 1.

Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke. Endothelcytoplasma (Punktraster) durch Basallamina von Gliallamelle (hell) getrennt. Messung der Cytoplasmadurchmesser dieser beiden Zelltypen senkrecht zur Basallamina. Um Fehlmessungen durch Schräganschnitte zu umgehen, erfolgt die Quotientenbildung (e/g) aus Durchmesser von Endothelzellcytoplasma (e) zu Gliazellcytoplasma (g). Verbreiterung des Gliaendfußes führt zu $e/g < 1$, Schwellung der Endothelzellen zu $e/g > 1$.

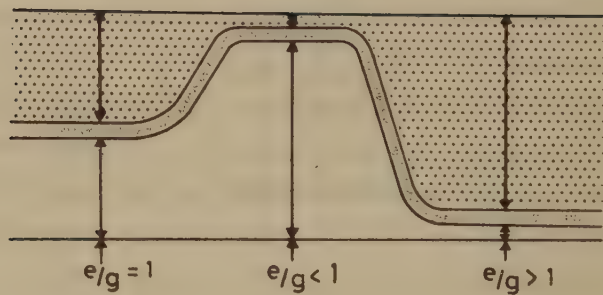
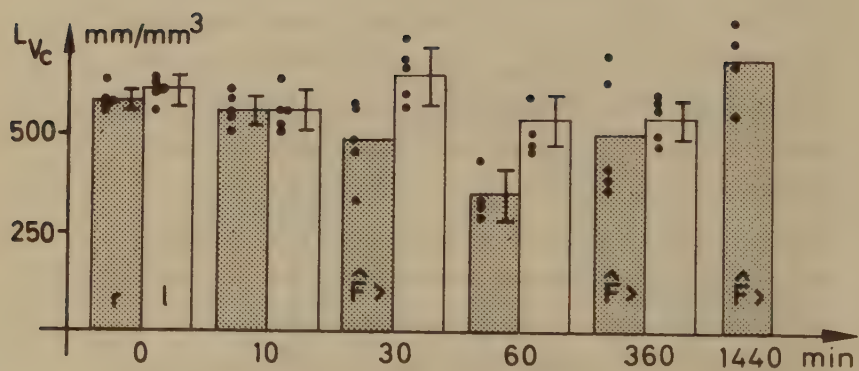
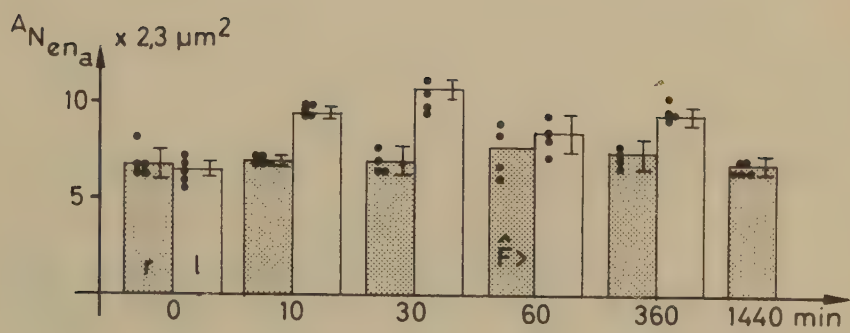


Abb. 2. Reaktionen des intrazerebralen Gefäßkompartiments auf das im linken parietalen Cortex (l) induzierte Kälteödem. Rechte Hemisphäre (r). $\hat{F}$ bedeutet eine so starke Streuung der Mittelwerte der Einzeltiere, daß kein Gruppenmittelwert gebildet werden kann. a) Die Kapillarreaktion im Stratum granulosum externum beider Hirnhälften (Schicht II.) kann an den Änderungen der erythrocytengefüllten Kapillarstrecke abgelesen werden (L_{VC}). Abnahme der Kapillarlänge ist gegenüber dem Ausgangswert im linken Cortex zwischen 10 und 30 min. mit $\hat{t} = 2,23 < t_{0,05}$ nicht signifikant, jedoch zwischen 30 und 60 min. mit $\hat{t} = 2,63 > t_{0,05}$ signifikant. Die Meßwerte der Kontrolltiere (L_{VC} : etwa 600 mm/mm^3) stimmen mit den Angaben von COBB (1932) über die Kapillarlänge der motorischen Rinde (515 mm/mm^3) des Kaninchens überein.

b) Die kapillären Endothelzellkerne der Schichten I (b) und II (c) in der Läsionszone vergrößern sich gleichförmig bis zu 30 min. nach der Kälteapplikation. Die Differenzen zwischen dem Ausgangswert der Kernfläche von Endothelzellen und dem Gruppenmittelwert in Schicht I. bzw. II. nach 10 min. sind links mit $\hat{t} = 9,61$ bzw. $\hat{t} = 9,25$ signifikant.





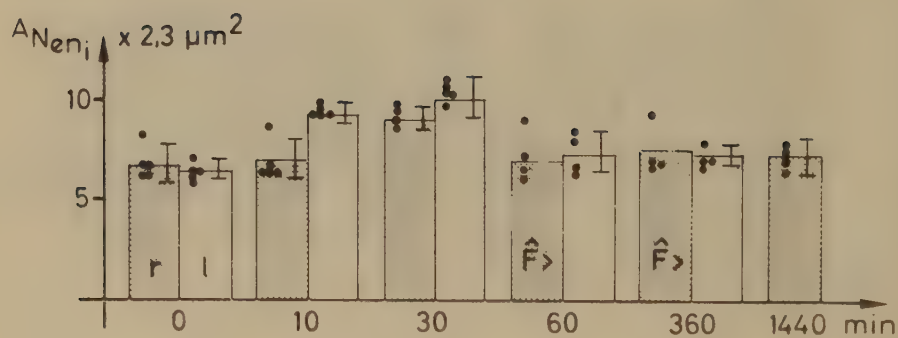
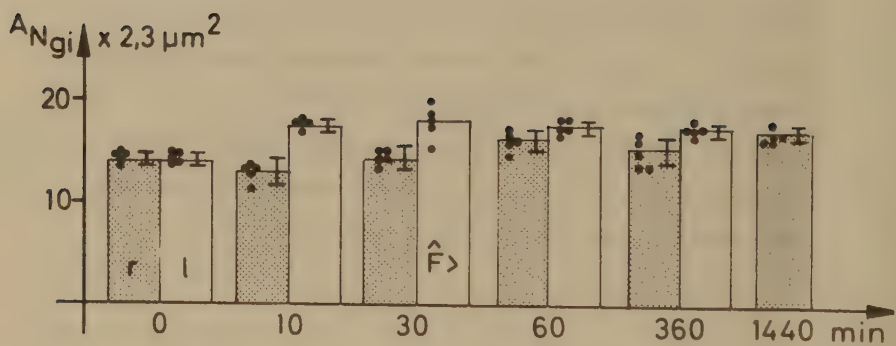


Abb. 3. Reaktion der Glia marginalis superficialis auf die linke parietale Kälteeinwirkung. Während auf der linksseitigen Cortex-Oberfläche die Kernfläche (A_{Ngm}) zunimmt (10 min.-Intervall: $\hat{t} = 8,04$), beobachtet man rechts eine Abnahme (Differenz zwischen Kontrollwert und 60 min.-Wert signifikant mit $\hat{t} = 11,32$).

Abb. 4. Reaktion der Nervenzell-Glia-Komplexe in der Schicht II. beider Hemisphären auf die linksseitige Einwirkung von flüssigem Stickstoff. In den ersten 30 min. vergrößern sich links die Zellkerne beider Zelltypen (Maximum: 30 min. nach Kälteeinwirkung).

a) Gliazellen. Signifikanz der Differenz von Kontrolltieren und Versuchstieren 60 min. nach Versuchsbeginn $\hat{t} = 4,53 > t_{0,05}$.

b) Neurone. Differenz zwischen den Gruppenmittelwerten der rechtsseitigen Neurone von Kontrolltieren und Versuchstieren 60 min. nach Versuchsbeginn ist mit $\hat{t} = 3,80 > t_{0,05}$ signifikant.



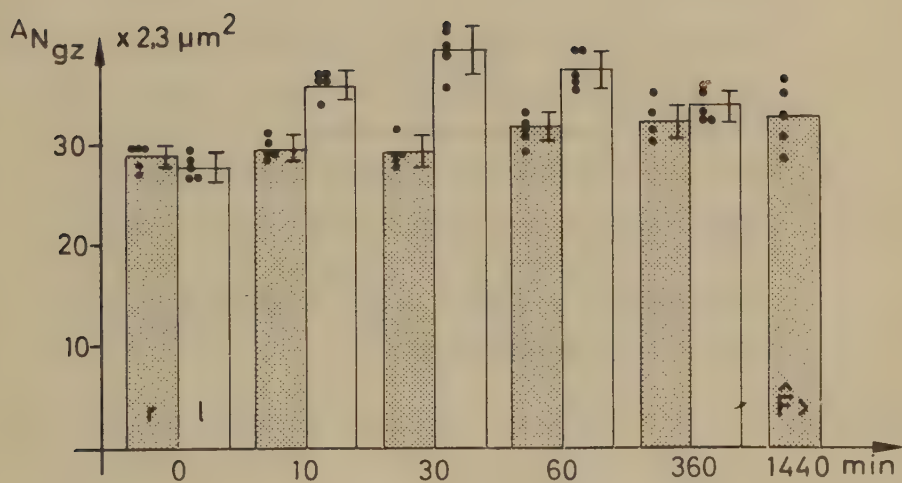


Abb. 5. Verteilung der Quotientenwerte aus Durchmesser des Endothelzellcytoplasmas zum Durchmesser der angrenzenden Giallamelle (e/g). Klassenbildung mit Abständen von 0,1 bis Quotientenwert 1 erreicht wird, dann Klassenabstände mit dem Wert 1. a) Kontrolltiere. Zweigipfelige Verteilungskurve der Quotienten. b - e) Mit zunehmender Schwellung der perikapillären Gliafortsätze steigt die Besetzung der Quotientenklassen 0,1 und 0,2 besonders in der linksseitigen Läsionszone (b,c), während rechts (d,e) eine Verbreiterung des Endothelzellcytoplasmas bei nur geringgradiger Durchmesseränderung benachbarter Gliafortsätze zu einer Vermehrung der Quotienten 1 führt. n - Anzahl der Messungen.

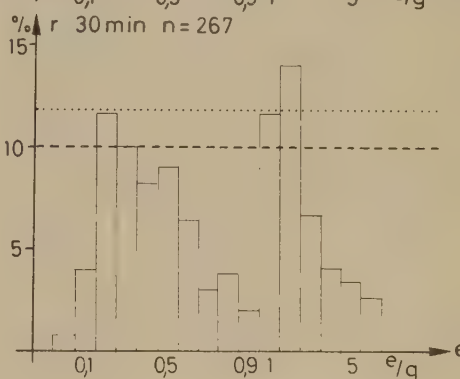
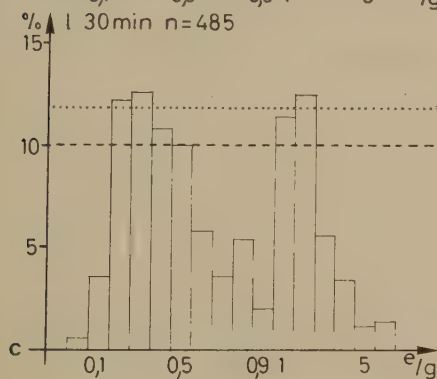
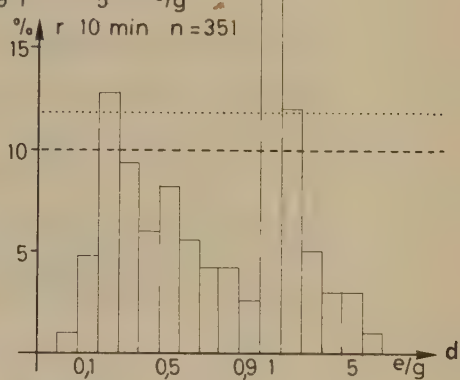
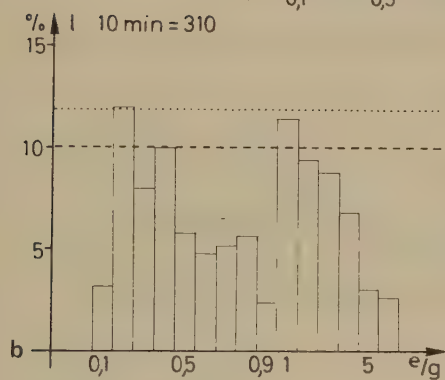
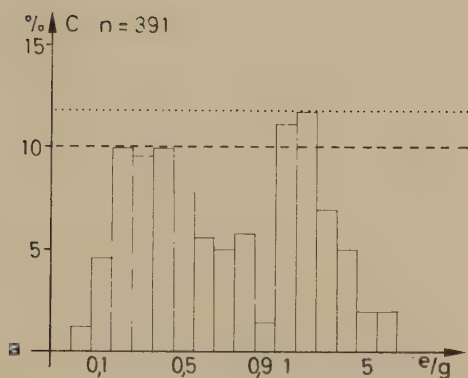


Abb. 6. Verteilung der maximalen Querdurchmesser zwischen Außenmembranen von Mitochondrien der kapillären Endothelzellen in der Schicht II. (D_{me}). a) Klassenverteilung in der Kontrolltiergruppe. Maximale Querdurchmesser von 126 nm überwiegen. b,c) Der maximale Mitochondriendurchmesser nimmt in der Läsionszone zu (1). d,e) Auch in der korrespondierenden rechten Rindenschicht II. (r) vergrößert sich der Mitochondriendurchmesser der Endothelzellen.

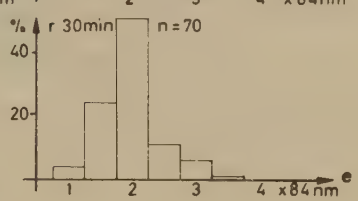
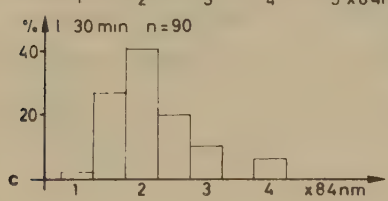
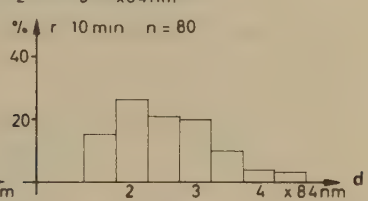
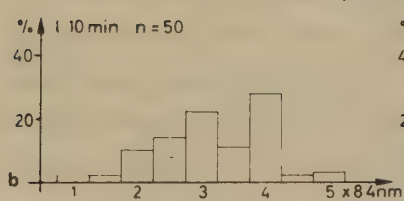
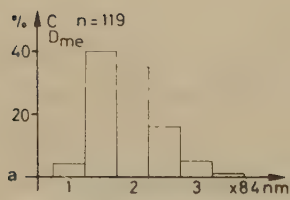


Abb. 7. Verteilung der maximalen Querdurchmesser zwischen den Außenmembranen von Mitochondrien in perikapillären Gliazellen der Schicht II. (D_{mg}). 30 min. nach Kälteeinwirkung wird die Identifizierung von Mitochondrien in Gliazellen der Läsionszone schwierig. Aus diesem Grund fehlt die entsprechende Verteilungskurve. a) Kontrolltiergruppe. Die Klasse mit einem Durchmesserwert von 252 nm ist am stärksten besetzt. b,c) 10 min. nach Versuchsbeginn vergrößert sich der mittlere Mitochondriendurchmesser sowohl in rechts-(r) als auch in linksseitigen (l) perikapillären Gliazellen. d) Nach 30 min. ist die Mitochondrienschwellung im rechtsseitigen Cortexareal nachweisbar.

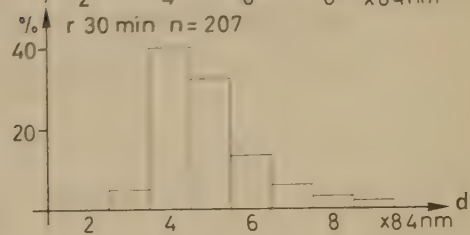
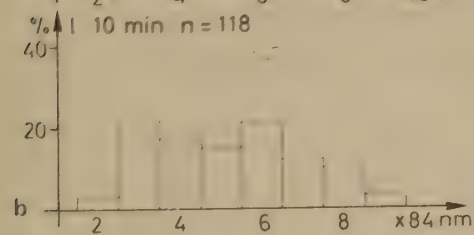
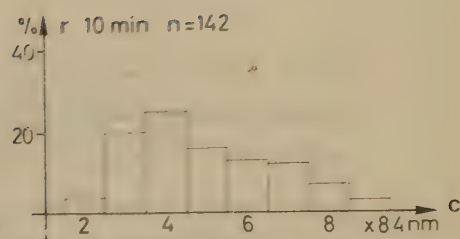
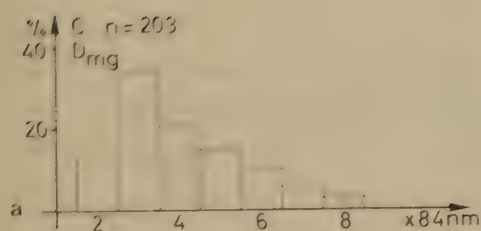


Abb. 8. Verteilung der kürzesten Abstände der Außenmembran von Endothelzell-Mitochondrien zu lumenseitigen Endothelzelloberflächen in der Schicht II. (L_{mes}). a) Kontrolltiere. Die minimale Diffusionsstrecke zwischen Mitochondrien und lumenseitiger Zelloberfläche liegt meist bei 42 nm. b, e) Im 10 min.- und 30 min.-Intervall vergrößert sich der mittlere Abstand auf 84 nm in beiden Hirnhälften.

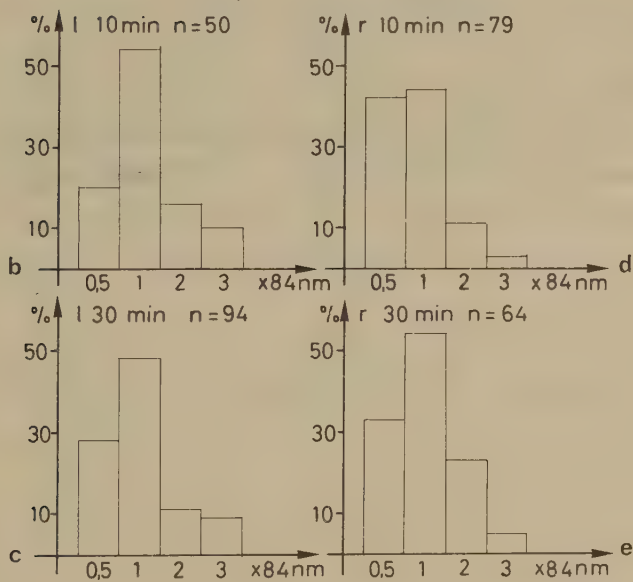
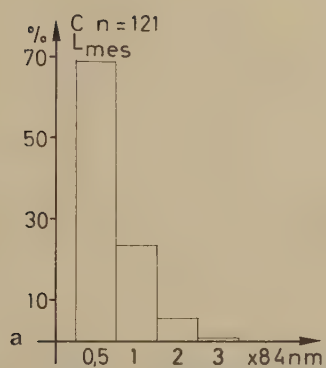


Abb. 9. Verteilung der kürzesten Abstände der Außenmembran von Endothelzell-Mitochondrien zur basalen Endothelzelloberfläche in der Schicht II. (L_{meb}). a) Kontrolltiere. b - e) Sowohl in Kapillaren des Läsionsgebietes als auch der korrespondierenden kontralateralen Rindenzone nimmt der Abstand zwischen Endothel-Mitochondrien und der Basallamina im 10 min.- und 30 min.-Intervall zu.

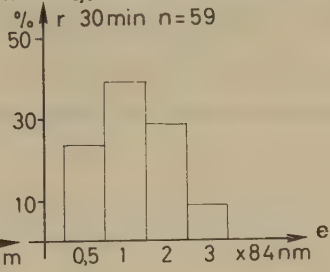
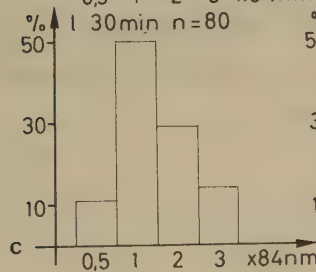
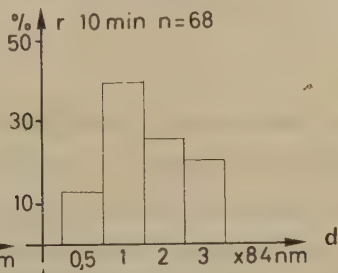
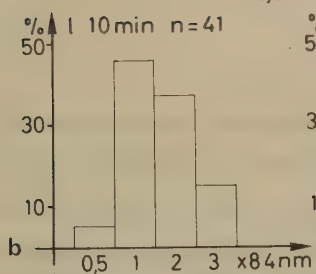
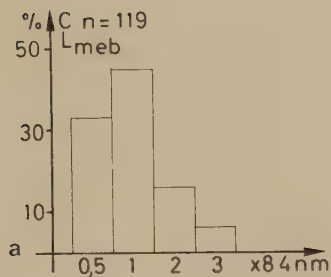


Abb. 10. Verteilung der kürzesten Abstände der Außenmembran von Gliazell-Mitochondrien zur basalen, der Basallamina der Kapillaren anliegenden Gliazelloberfläche in der Schicht II. (L_{mgb}). a) Kontrolltiere. b - d) Erst nach 30 min. (d) vergrößert sich der minimale Abstand zwischen Glia-Mitochondrien und der kapillären Basallamina im rechtsseitigen Cortex. In diesem Zeitintervall ist ein Vergleich mit dem Verhalten der Glia-Mitochondrien in der Läsionszone nicht möglich (s.S. 91).

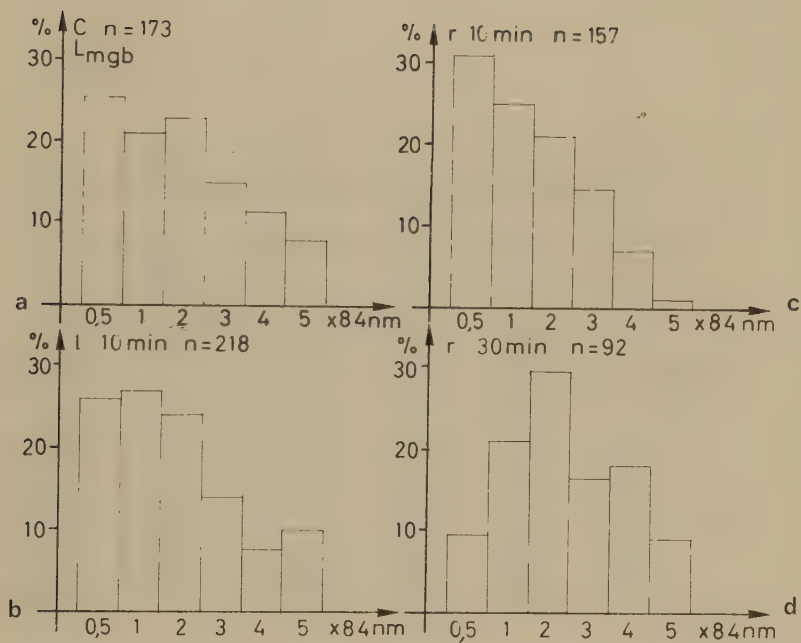
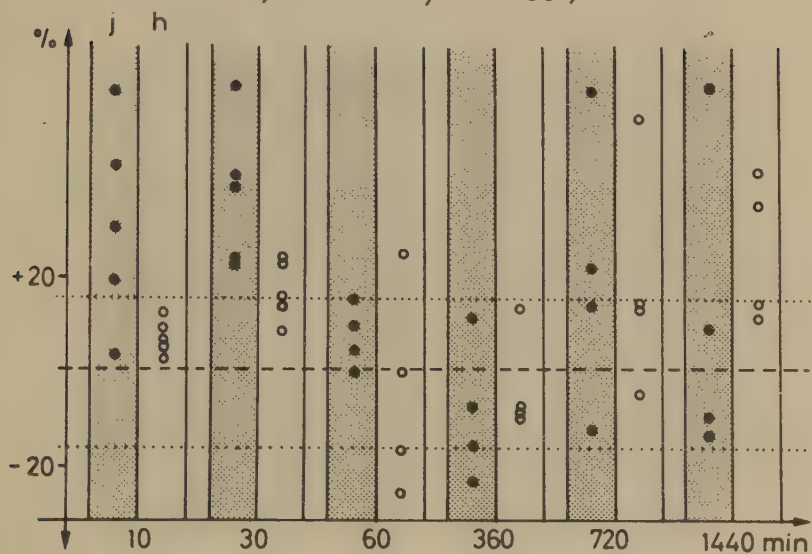
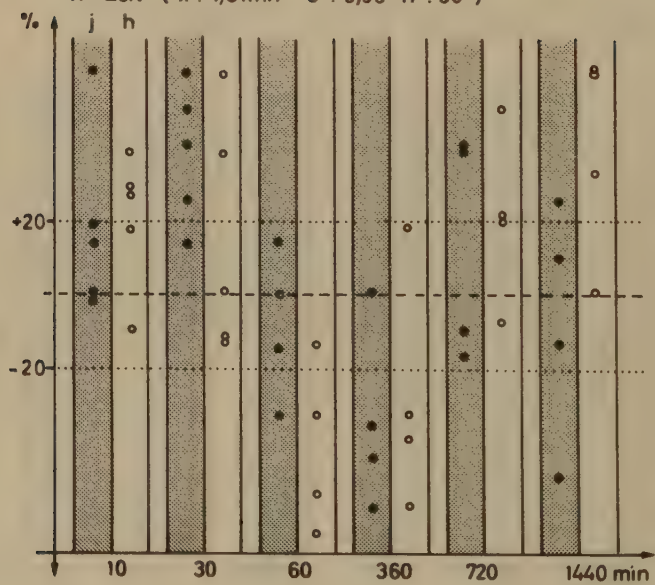


Abb. 11. Änderung des Gerinnungspotentials im intra (j) - und extra-
kraniellen (h) Gefäßkompartiment während des kälteinduzierten Hirn-
ödems: TEG-Messungen (s. Text). a) r - Zeit, b) K - Zeit, c) m_E .
Angaben in prozentualen Abweichungen vom Mittelwert (-----),
Streuung (.....).

r-Zeit ($\bar{x} : 11,8 \text{ min}$ $\delta : 2,6$ $n : 30$)



K - Zeit ($\bar{x}$: 4,6 min σ : 0,93 n : 30)



$m_c (\bar{x} : 52,2 \text{ mm } \sigma : 5,3 \text{ n : 30 })$

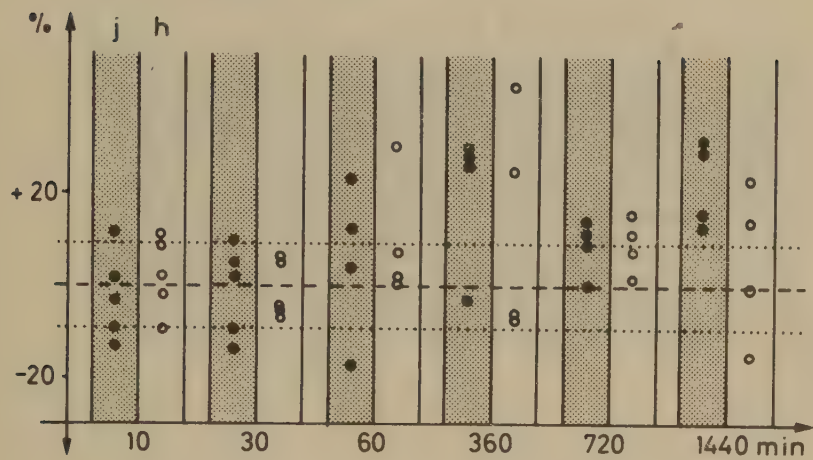


Abb. 12. Änderung des Gerinnungspotentials im intra- und extra-
kraniellen Gefäßkompartiment während des kälteinduzierten Hirn-
ödems: Einphasengerinnungstest nach QUICK. Graphische Dar-
stellung wie in Abb. 11.

Quick-Wert ($\bar{x} : 93,3\% \sigma : 9,9 n : 30$)

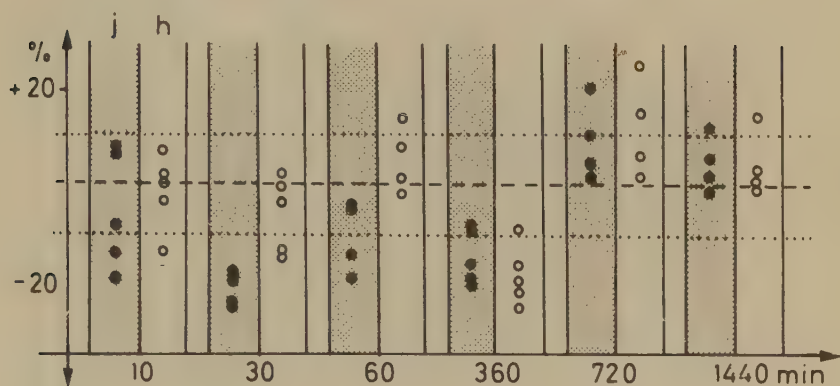


Abb. 13. Änderung des Gerinnungspotentials im intra- und extra-
kraniellen Gefäßkompartiment während des kälteinduzierten Hirn-
ödems: Aktivitäten von Faktor V. Graphische Darstellung wie in
Abb. 11.

Faktor V ($\bar{x}$: 99,3 % σ : 13,7n : 30)

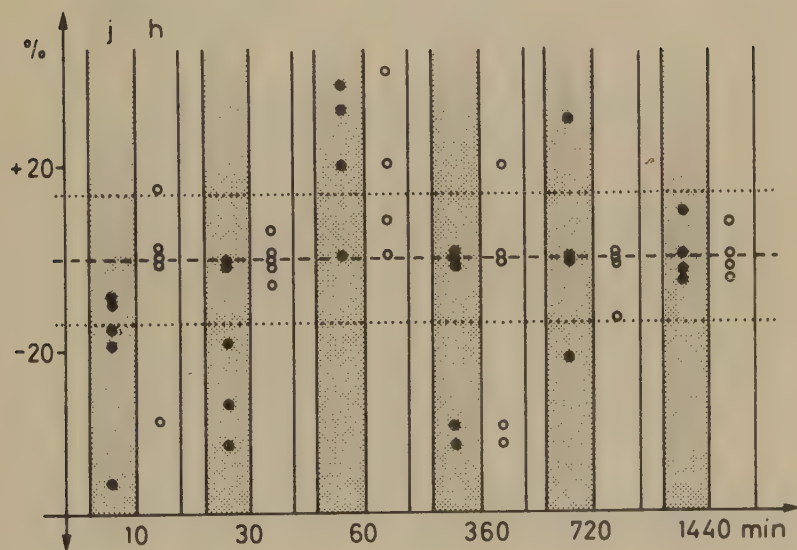


Abb. 14. Änderung des Gerinnungspotentials im intra- und extra-
kraniellen Gefäßkompartiment während des kälteinduzierten Hirn-
ödems: Anzahl der Thrombozyten. Graphische Darstellung wie in
Abb. 11.

Thrombozyten($\bar{x}$: 187.000 σ : 50.000 n : 30)

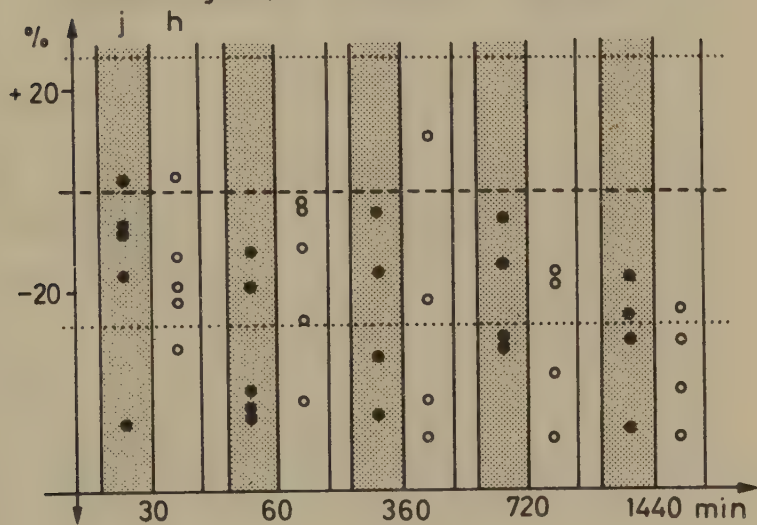
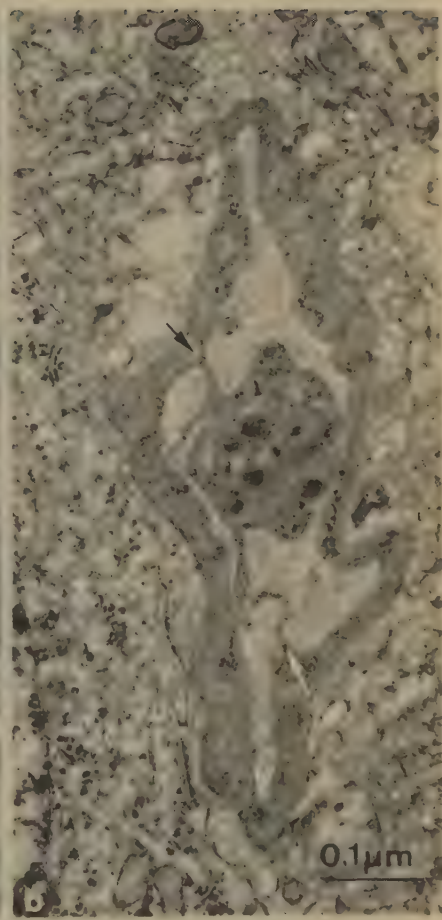
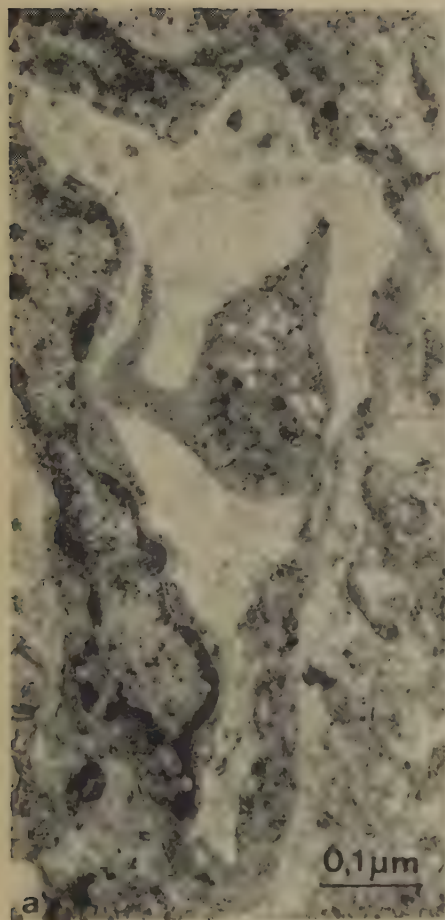


Abb. 15. Thrombozyten in Kapillaren der Läsionszone. a) 10 min. nach Versuchsbeginn b) 30 min. nach Versuchsbeginn. Zunahme der Endothelzelleisten (↑) Vergr. 28000-fach.

c) Ablagerung von fibrillärem Material (↑) in der linken Hemisphäre 24 Stunden nach Kälteeinwirkung. Die fibrillären Niederschläge kommen intrakapillär (1), in Endothelzellen (2), im Perikapillarraum (3) und in Astrozytenendfüßen (4) vor. Kapillarquerschnitt. Vergr. 28000-fach. A - Astrozytenendfuß, E - Erythrozyten, N - Endothelzellkern. d) Manche Faseranschnitte zeigen periodische Querstreifung, die der von Fibrinpräzipitaten entspricht (Periodenlänge 230 - 240 Å).



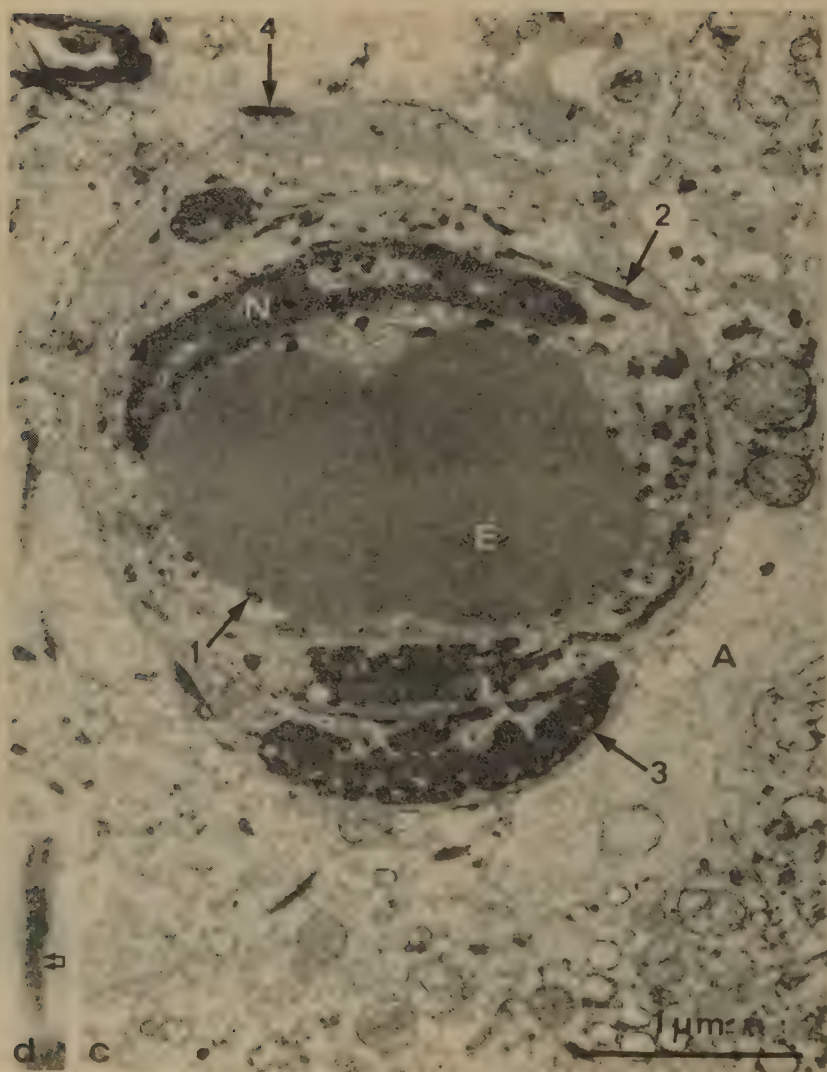


Abb. 16. Graphen, die hochsignifikante Korrelationen zwischen den Änderungen der Kapillarlänge (L_{Vc}) und der Kernfläche von Endothelzellen (A_{Nena} in Schicht I.; A_{Neni} in Schicht II.), Gliazellen (A_{Ngm} Glia marginalis superficialis; A_{Ngi} Glia in Schicht II.) und Ganglienzellen (A_{Ngz} in Schicht II.) darstellen. Verknüpfungen zwischen Parameteränderungen der gleichen (—) und der kontralateralen (-----) Hemisphäre. l - linke Hemisphäre (Läsionszone), r - rechtsseitiges korrespondierendes Areal.

a) 10 min.-Intervall.

Korrelationen lassen sich nur zwischen Parameteränderungen der linken Hemisphäre (Läsionszone) errechnen. Die Kernvergrößerungen der Endothelzellen in den linksgelegenen Schichten I. ($A_{Nena\ l}$) und II. ($A_{Neni\ l}$) sowie der Glia marginalis superficialis ($A_{Ngm\ l}$) sind durch die meisten Korrelationen verbunden (Verknüpfungsgrad = 3).

b) 30 min.-Intervall.

Erstmals treten Korrelationen zwischen Parameteränderungen in gegenüberliegenden korrespondierenden Cortexabschnitten auf (-----). Die Zunahme der Kernfläche von kapillären Endothelzellen in der rechtsgelegenen Rindenschicht II. ($A_{Neni\ r}$) ist durch drei signifikante Korrelationen mit Kernreaktionen von Endothel- und Ganglienzellen in der Läsionszone verbunden.

c) 60 min.-Intervall.

Die Zahl der Korrelationen zwischen Parameteränderungen in gegenüberliegenden korrespondierenden Cortexabschnitten hat zugenommen. Die Ödembreite in der linken Hemisphäre (Kälteläsion) wirkt sich zunehmend auf die Funktion der Ganglienzell-Glia-Komplexe in der rechtsgelegenen Rindenschicht II. aus; hiermit ist die Abnahme der erythrozytengefüllten Kapillarestrecke im gleichen Cortexabschnitt eng verknüpft.

